

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELÉTRICA**

Júlia Vianna Gallinaro

**ESTUDO DE MODELOS MATEMÁTICOS DE
FRONTEIRA MÓVEL PARA APLICAÇÃO EM
MIGRAÇÃO CELULAR**

Florianópolis

2013

Júlia Vianna Gallinaro

**ESTUDO DE MODELOS MATEMÁTICOS DE
FRONTEIRA MÓVEL PARA APLICAÇÃO EM
MIGRAÇÃO CELULAR**

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Engenharia
Elétrica para a obtenção do Grau de
Mestre em Engenharia Elétrica.
Orientadora: Prof^ª. Daniela Ota
Hisayasu Suzuki, Dr^ª.
Coorientador: Prof. Fernando
Mendes de Azevedo, D.Sc.

Florianópolis

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gallinaro, Júlia Vianna

Estudo de modelos matemáticos de fronteira móvel para aplicação em migração celular / Júlia Vianna Gallinaro ; orientadora, Daniela Ota Hisayasu Suzuki ; co-orientador, Fernando Mendes de Azevedo. - Florianópolis, SC, 2013. 79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica.

Inclui referências

1. Engenharia Elétrica. 2. Modelo matemático. 3. Migração celular. 4. Melanoma. 5. Fator de necrose tumoral-alpha. I. Suzuki, Daniela Ota Hisayasu. II. Azevedo, Fernando Mendes de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica. IV. Título.

Júlia Vianna Gallinaro

**ESTUDO DE MODELOS MATEMÁTICOS DE
FRONTEIRA MÓVEL PARA APLICAÇÃO EM
MIGRAÇÃO CELULAR**

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Elétrica” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 01 de julho de 2013.

Prof. Patrick Kuo-Peng, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Elétrica

Prof^a. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dr^a.
Orientadora

Prof. Fernando Mendes de Azevedo, D.Sc..
Coorientador

Banca Examinadora:

Prof^a. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dr^a.
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora (continuação):

Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, PhD.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. José Marino Neto, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Euler de Vilhena Garcia, Dr.
Universidade de Brasília

À minha família

AGRADECIMENTOS

À professora Daniela pela orientação e apoio ao longo desse processo e pela inicialização no mundo acadêmico.

Aos meus pais Renata e Arsenio pela ajuda imensurável em encontrar o meu caminho. Pela minha formação, pelo suporte e pelo exemplo.

À minha irmã Clarice pela amizade e pelo modelo pessoal. Minha admiração por você só cresce.

Ao Luiz pelo companheirismo, apoio e pela serenidade, inclusive nos momentos difíceis.

Aos meus amigos pelos momentos de descontração que contrabalançaram a seriedade necessária. Aos colegas de mestrado e de laboratório pela amizade, motivação e troca de experiências.

À professora Claudia e aos professores da Engenharia Biomédica pela formação, apoio e tempo dedicado.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram com a minha formação e com este trabalho.

RESUMO

Modelos matemáticos tem sido desenvolvidos visando o auxílio no diagnóstico e tratamento de diversos tipos de câncer. No caso de melanomas, estes modelos podem auxiliar a programação de cirurgia para remoção. Nestas cirurgias, há criação de um ambiente inflamatório, o que pode favorecer a migração celular, devido à presença de Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), aumentando as chances de reincidência do câncer e desenvolvimento de metástases. Neste trabalho, três diferentes modelos matemáticos foram utilizados para modelar a migração de células de melanoma *in vitro*, em controle e tratadas com TNF- α . O primeiro é um modelo baseado em difusão pela Lei de Fick. Foi observada uma diferença entre os valores de coeficiente de difusão de células de câncer utilizados em modelos matemáticos ($0,01 - 1 \text{ mm}^2 \text{ dia}^{-1}$ aproximadamente) e obtidos experimentalmente ($50 - 80 \text{ mm}^2 \text{ dia}^{-1}$ aproximadamente). Uma explicação seria estes modelos não considerarem, a princípio, a migração coletiva de células. O segundo foi um modelo contínuo elástico, desenvolvido com base em aspectos da migração coletiva. Matematicamente os resultados foram satisfatórios, com coeficiente de determinação superior a 0,89 para os dois casos, porém eles sugerem que a migração celular diminui com o aumento da adesão célula-superfície, o que não está de acordo com resultados de trabalhos experimentais da área. No terceiro, foi proposta uma mudança no modelo contínuo elástico, para permitir uma taxa de proliferação variável no tempo. Mais uma vez, os resultados foram matematicamente satisfatórios, mas biologicamente diferente do esperado. Os resultados sugerem novamente que a migração celular diminui com o aumento da adesão célula-superfície e que a força criada pela formação de pseudópodes teria sentido contrário à migração. Sendo assim, conclui-se que estes resultados ocorrem devido ao equacionamento e propõe-se um estudo mais aprofundado da influência da constante de adesão nos resultados, para futura proposta de alteração do modelo contínuo elástico.

Palavras-chave: Modelo matemático, migração celular, melanoma, fator de necrose tumoral-alpha.

ABSTRACT

Mathematical models have been developed in order to aid diagnosis and treatment of different types of cancer. In the case of melanoma, these models can help when programming removal surgery. In those surgeries, an inflammatory environment is created, which favors cell migration due to the presence of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α). This can lead to metastasis and cancer reappearance. In this work, three different mathematical models were used to model melanoma cell migration *in vitro*, in control and treated with TNF- α . The first model was based on Fick's Law of diffusion. Results show a difference between mathematically used and experimentally obtained cancer cells diffusion coefficients, $0,01 - 1 \text{ mm}^2 \text{ dia}^{-1}$ and $50 - 80 \text{ mm}^2 \text{ dia}^{-1}$ respectively. This could be explained by the fact that this type of model does not account for collective cell migration. The second model was an elastic continuum one, based on aspects of collective cell migration. Results were mathematically satisfactory, with coefficient of determination greater than 0,89 in both cases, but they suggest cell migration decreases with enhanced cell-surface adhesion, which is not in accordance with experimental work results. An alteration on the elastic continuum model was proposed, allowing not constant proliferation rate. Once again, results were mathematically satisfactory, but biologically different than expected. Results suggest once more that cell migration decreases with enhanced cell-surface adhesion and that the force created by pseudopodia formation would be in the opposite direction of cell migration. Thus, the conclusion is that these results are due to the equations and further studies on the influence of the adhesion constant on the results should be conducted, so changes on the elastic continuum model can be proposed.

Keywords: Mathematical model, cell migration, melanoma, tumor necrosis factor- α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Passos da migração celular	28
Figura 2	Migração coletiva de células	29
Figura 3	Fluxograma para matriz Jacobiana	31
Figura 4	Modelo baseado em difusão - concentração celular	39
Figura 5	Modelo baseado em difusão - migração das células	40
Figura 6	Migração coletiva: experimental e modelo matemático ..	43
Figura 7	Modelo contínuo elástico - representação esquemática ..	49
Figura 8	Modelo contínuo elástico - migração das células	52
Figura 9	Modelo contínuo elástico - migração sem proliferação ..	52
Figura 10	Modelo contínuo elástico - migração para diferentes valores de κ	53
Figura 11	Modelo contínuo elástico - gradiente de deformação	54
Figura 12	Modelo contínuo elástico II - comportamento genérico da taxa de proliferação	61
Figura 13	Modelo contínuo elástico II - migração das células	64
Figura 14	Modelo contínuo elástico II - taxa de proliferação	65
Figura 15	Modelo contínuo elástico II - migração sem proliferação e sem deformação	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Modelo baseado em difusão - erros da comparação com dados experimentais.....	41
Tabela 2	Modelo contínuo elástico - valores de constantes obtidos com regressão não linear	51
Tabela 3	Modelo contínuo elástico II- coeficiente de determinação	63
Tabela 4	Modelo contínuo elástico II- valores de constantes obtidos com regressão não linear	64
Tabela 5	Efeito TNF- α com taxa de proliferação variável e constante.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - α	23
MEC	Matriz extracelular	23

LISTA DE SÍMBOLOS

J	Matriz Jacobiana	30
c	Concentração de células tumorais (<i>células</i> mm^{-2})	36
t	Tempo Cap.3 (<i>dia</i>)	36
D_c	Coefficiente de difusão (mm^2 <i>dia</i> $^{-1}$)	36
α_c	Taxa de crescimento <i>per capita</i> (<i>dia</i> $^{-1}$)	36
K_c	Densidade celular acima da qual a proliferação não acontece (<i>células</i> mm^{-2})	36
d_1	Constante angular do coeficiente de difusão (mm^3 <i>dia</i> $^{-1}$ <i>células</i> $^{-1}$)	36
d_2	Constante linear do coeficiente de difusão (mm^2 <i>dia</i> $^{-1}$)	36
c_0	Concentração inicial de células tumorais (<i>células</i> mm^{-2})	36
s	Posição de uma célula na camada original de células (μm)	48
t	Tempo Cap.4 (<i>h</i>)	48
$x(t, s)$	Posição da célula localizada em s na camada original no ins- tante t (μm)	48
k	Módulo de elasticidade (nN)	48
b	Constante de adesão da interação célula-superfície (h nN μm^{-2})	48
ε	Gradiente de deformação (adimensional)	48
\hat{s}	Posição hipotética de uma célula caso toda a deformação da camada fosse removida (μm)	48
g	Gradiente de crescimento (adimensional)	48
ρ	Taxa de crescimento (h^{-1})	49
F	Força de propulsão dos pseudópodes (nN)	49
κ	Razão entre o módulo de elasticidade e a constante de adesão (μm^2 h^{-1})	50
φ	Razão entre a força de propulsão dos pseudópodes e o módulo de elasticidade (adimensional)	50
k_1	Constante da taxa de proliferação (h^{-1})	61
k_2	Constante da taxa de proliferação (<i>adimensional</i>)	61
k_3	Constante da taxa de proliferação (h)	61
k_4	Constante da taxa de proliferação (h^{-1})	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVO GERAL	24
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
1.3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	25
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1 MELANOMA	27
2.2 MIGRAÇÃO CELULAR	28
2.3 MODELOS MATEMÁTICOS DE CRESCIMENTO TUMORAL	30
2.4 REGRESSÃO NÃO LINEAR POR APROXIMAÇÃO NUMÉRICA	30
2.4.1 Montagem da matriz Jacobiana	32
2.5 PROBLEMAS DE STEFAN	33
3 MODELO BASEADO EM DIFUSÃO	35
3.1 METODOLOGIA	35
3.2 RESULTADOS	38
3.3 DISCUSSÃO	40
3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
4 MODELO CONTÍNUO ELÁSTICO I	47
4.1 METODOLOGIA	48
4.2 RESULTADOS	51
4.3 DISCUSSÃO	53
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
5 MODELO CONTÍNUO ELÁSTICO II	59
5.1 METODOLOGIA	59
5.2 RESULTADOS	63
5.3 DISCUSSÃO	63
5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS	73
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, atualmente ocorrem no mundo entre 2 e 3 milhões de casos de câncer de pele tipo não-melanoma e 132 mil casos do tipo melanoma (WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). No Brasil, as estimativas para 2012 destas duas neoplasias são de 134 mil e 6 mil novos casos respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Apesar de representar cerca de 5% do total de ocorrências, os melanomas são responsáveis pela maior parte das mortes deste tipo de câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

Melanomas podem se desenvolver em duas fases: crescimento radial e crescimento vertical. Melanomas em fase de crescimento radial podem ser removidos cirurgicamente com alta taxa de sucesso (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007), diferentemente dos melanomas em fase de invasão vertical, que podem tornar-se metastáticos, apresentando um prognóstico ruim (BRESLOW, 1970). Quando o melanoma é detectado em estágios iniciais, a taxa de sobrevivência é de 98%, caindo para até 16% em estágios mais avançados (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

Estudos têm mostrado uma relação entre processos inflamatórios e o surgimento e desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, bem como a diminuição de incidência e mortalidade de diversos tipos de tumores através do tratamento com agentes anti-inflamatórios não esteróides (MANTOVANI *et al.*, 2008). Durante processos inflamatórios, são produzidas citocinas como o Fator de Necrose Tumoral - α (TNF- α), que promovem uma maior ativação de moléculas de adesão (ZHU *et al.*, 2002). A migração de células tumorais depende da formação de complexos focais, que promovem a adesão da célula à matriz extracelular (MEC) (LAUFFENBURGER; HORWITZ, 1996; RIDLEY *et al.*, 2003). Células tumorais podem migrar de maneira individual ou coletiva e a maneira como elas migram é determinada pela relação com a MEC. Em comparação a movimentações individuais, movimentações coletivas, como o caso de melanomas, apresentam uma migração mais dependente da adesão entre a célula e a MEC (FRIEDL; WOLF, 2003). Estudos mostraram que a presença de TNF- α aumentou a migração de células de melanoma (ZHU *et al.*, 2002, 2004; CANTÓN *et al.*, 2003; KATERINAKI *et al.*, 2006; REDPATH *et al.*, 2009), ao mesmo tempo que a presença do peptídeo anti-inflamatório α -MSH reduziu a migração (ZHU *et al.*, 2002, 2004; CANTÓN *et al.*, 2003).

Quando melanomas cutâneos são removidos cirurgicamente, cria-se um ambiente inflamatório que pode favorecer recorrências locais após a cirurgia (REDPATH *et al.*, 2009) e a medida de área a ser extraída no tratamento cirúrgico de melanoma é ainda um tema controverso. Para definição da área a ser extraída, são utilizadas classificações como os Níveis de Clark, que relaciona o nível de invasão do tumor com o prognóstico clínico, e a espessura Breslow, que refinou a classificação de Clark demonstrando uma relação entre a espessura do tumor e o prognóstico de sobrevivência do paciente (BRESLOW, 1970). Segundo estudo apresentado por KUNISHIGE; BRODLAND; ZITELLI (2011), a margem atualmente aceita, baseada em uma opinião consensual de 1992, é inadequada e pode não extrair completamente as células cancerígenas, aumentando as chances de reincidência, o que deverá ocorrer em até 20% dos casos.

Modelos matemáticos de crescimento tumoral e migração celular vêm sendo desenvolvidos visando o auxílio no diagnóstico e tratamento de diversos tipos de câncer (ANDERSON *et al.*, 2000; ANDERSON, 2005; CIARLETTA; FORET; AMAR, 2011; EIKENBERRY; THALHAUSER; KUANG, 2009; TOHYA *et al.*, 1998). Alguns destes modelos apresentam um sistema de equações não dimensional (ANDERSON *et al.*, 2000; ANDERSON, 2005; TOHYA *et al.*, 1998), o que dificulta a comparação quantitativa com trabalhos realizados experimentalmente. Outros modelos, como o desenvolvido por EIKENBERRY; THALHAUSER; KUANG (2009), apresentam equações dimensionais, porém não realizam o estudo para comparação quantitativa dos resultados obtidos pelo modelo com resultados obtidos experimentalmente. Isto resulta em modelos que podem indicar a forma como a migração celular e a invasão tumoral ocorrem, mas não necessariamente são capazes de descrever situações obtidas experimentalmente.

1.1 OBJETIVO GERAL

Modelar a migração de células de melanoma em um ensaio *scratch wound*, através do rastreamento da fronteira da camada de células.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar modelos matemáticos de migração de células de melanoma *in vitro*;

- Implementar o modelo selecionado;
- Simular o modelo para comparação com dados experimentais.

1.3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho está organizado conforme descrito a seguir. O Capítulo 2 apresenta uma fundamentação teórica de assuntos que serão tratados ao longo do trabalho. Os Capítulos 3, 4 e 5 consistem de estudos individuais divididos em: introdução, metodologia, resultados, discussão e considerações finais. No Capítulo 6 é feita uma discussão comum a todos os estudos e o Capítulo 7 mostra a conclusão final do trabalho.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Para a melhor compreensão dos modelos matemáticos de migração de células de melanoma, é necessária uma fundamentação teórica sobre melanoma, migração celular e modelos matemáticos de crescimento tumoral, que será apresentada neste capítulo. As equações contidas neste trabalho não foram resolvidas de forma analítica, por isso este capítulo mostra também uma metodologia para regressão não linear por aproximação numérica. Por fim, serão apresentados conceitos dos problemas de Stefan, também necessários para a melhor compreensão dos modelos apresentados.

2.1 MELANOMA

O câncer de pele pode ser dividido em dois grupos: melanoma e não-melanoma. Melanomas têm início a partir de alterações nos melanócitos, células da pele que produzem melanina (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012). O melanoma possui uma forma de crescimento radial, que ocorre na epiderme. Células de crescimento radial podem progredir para uma fase de invasão vertical (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007), em que as células ultrapassam a membrana basal e invadem a derme, uma região vascularizada.

As células de câncer são caracterizadas pela proliferação anormal e invasão de outros tecidos. Em alguns casos, células de câncer podem entrar na corrente sanguínea ou no sistema linfático e propagar-se para outras partes do corpo, que não onde originalmente estavam. Quando estas células estabelecem-se novamente em outro local, este processo é conhecido como metástase. O prognóstico de pacientes com metástase é pior que o de pacientes em que metástases não ocorreram.

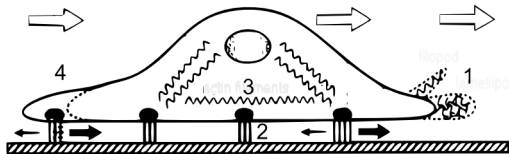
Os possíveis tratamentos para melanoma incluem cirurgia, quimioterapia, imunoterapia e radioterapia. O principal tratamento para a maioria dos casos de melanoma é a cirurgia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012), que cura a maior parte dos melanomas em estágio inicial (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012). No entanto, quando o câncer já se espalhou para outras partes do corpo, há uma probabilidade menor de cura com cirurgia.

2.2 MIGRAÇÃO CELULAR

O processo de migração celular se inicia com uma polarização química no interior da célula, que define a formação de uma parte traseira e de uma parte dianteira. A partir deste ponto, o processo pode ser dividido em 5 passos. Uma revisão detalhada deste modelo pode ser vista no trabalho de LAUFFENBURGER; HORWITZ (1996).

1. Protusão da borda dianteira da célula: a polimerização de actina em filamentos de actina empurra a membrana da célula, promovendo a extensão de um pseudópode.
2. Formação de complexos focais: integrinas se ligam a ligantes da MEC e agrupam-se na membrana, promovendo adesão entre a célula e a MEC.
3. Degradação da MEC: a concentração de proteases¹ torna-se maior nas regiões próximas aos locais de adesão, o que leva à degradação de elementos da MEC.
4. Contração celular: a célula se contrai por ação do complexo actomiosina.
5. Liberação da parte traseira da célula: devido à polarização, os contatos focais da parte traseira da célula são mais fracos e se desfazem, o que faz com que a célula se movimente.

Figura 1 – Figura mostrando alguns passos da migração celular descritos: (1) formação de pseudópode, (2) complexos focais, (3) contração dos filamentos de actina, (4) liberação da parte traseira da célula. Adaptado de (LAUFFENBURGER; HORWITZ, 1996)



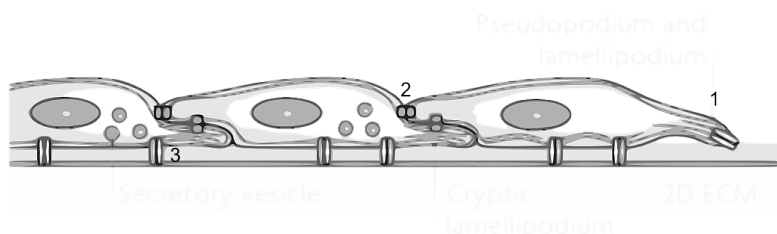
As células podem migrar de maneira individual ou coletiva. A migração individual pode ser *mesenchymal* ou *ameboide*. A migração *mesenchymal* consiste dos 5 passos descritos acima e representa um

¹Enzimas que quebram ligações entre aminoácidos de proteínas

mecanismo eficiente para disseminação de células de câncer e metástases. Ela depende de tração e de uma força de adesão alta. Em comparação à *mesenchymal*, a migração *ameboide* é mais rápida e menos dependente da adesão à MEC. Neste tipo de migração, há um ciclo alternante rápido de movimentos de expansão e contração morfológica e a movimentação ocorre sem a formação de complexos focais (FRIEDL; WOLF, 2003).

Na migração coletiva, são observadas adesões célula-célula, que promovem a formação de agregados. Estes agregados passam a ser uma unidade funcional (FRIEDL; GILMOUR, 2009), havendo portanto uma distinção entre as células chamadas *líderes*, localizadas na fronteira dianteira (em relação ao sentido de deslocamento) do agregado, e as demais células, chamadas *seguidoras*.

Figura 2 – Figura mostrando configuração das células durante migração coletiva. (1) formação de pseudópode na célula líder, (2) adesões célula-célula, (3) complexos focais. Adaptado de (FRIEDL; GILMOUR, 2009)



Uma determinada célula não migra apenas de forma individual ou apenas de forma coletiva, necessariamente. Já foram observadas situações de transição entre os tipos de migração descritos anteriormente, a chamada plasticidade de migração celular (FRIEDL; GILMOUR, 2009). Nestas situações, determinadas características estimulam a transição, como por exemplo a perda de interações célula-célula. Esta plasticidade tem um papel importante na formação de metástases, já que permite que células se separem de agregados e passem a se movimentar individualmente.

Uma revisão detalhada sobre migração de células tumorais, tanto individual quanto coletiva, e sua plasticidade pode ser lida nos trabalhos de FRIEDL; WOLF (2003) e FRIEDL; GILMOUR (2009).

2.3 MODELOS MATEMÁTICOS DE CRESCIMENTO TUMORAL

Uma das classificações de modelos matemáticos os divide entre contínuos e discretos, de acordo com a natureza de suas variáveis, que podem ser contínuas ou discretas. Estes dois tipos já foram utilizados para a modelagem de crescimento e migração de células de câncer. Os modelos mais comuns de crescimento tumoral, por exemplo, são modelos contínuos baseados em processos de difusão, que possuem equações diferenciais parciais que descrevem a variação de concentração de células de câncer, células saudáveis, entre outras variáveis. EIKENBERRY; THALHAUSER; KUANG (2009), por exemplo, apresentaram um modelo de crescimento de melanoma baseado em difusão. Como exemplo de modelos discretos, pode-se citar os modelos baseados em agente. Este é o caso do modelo proposto por WYNN; KULESA; SCHNELL (2012), que modelaram a migração coletiva de células utilizando um modelo baseado em agente. Alguns modelos, como o desenvolvido por ANDERSON (2005), são modelos híbridos, com partes contínuas e discretas.

ANDERSON; QUARANTA (2008) dividem os modelos matemáticos de câncer em dois grupos: descritivos e mecanísticos. Os modelos descritivos analisam o crescimento tumoral de forma macro, sendo utilizados em geral para investigar a dinâmica populacional das células tumorais. Já os modelos mecanísticos focam em aspectos específicos da progressão tumoral, para explicar os processos biológicos envolvidos na mesma. Os modelos em geral não são exclusivamente descritivos e nem mecanísticos, mas sim uma mistura entre os dois.

2.4 REGRESSÃO NÃO LINEAR POR APROXIMAÇÃO NUMÉRICA

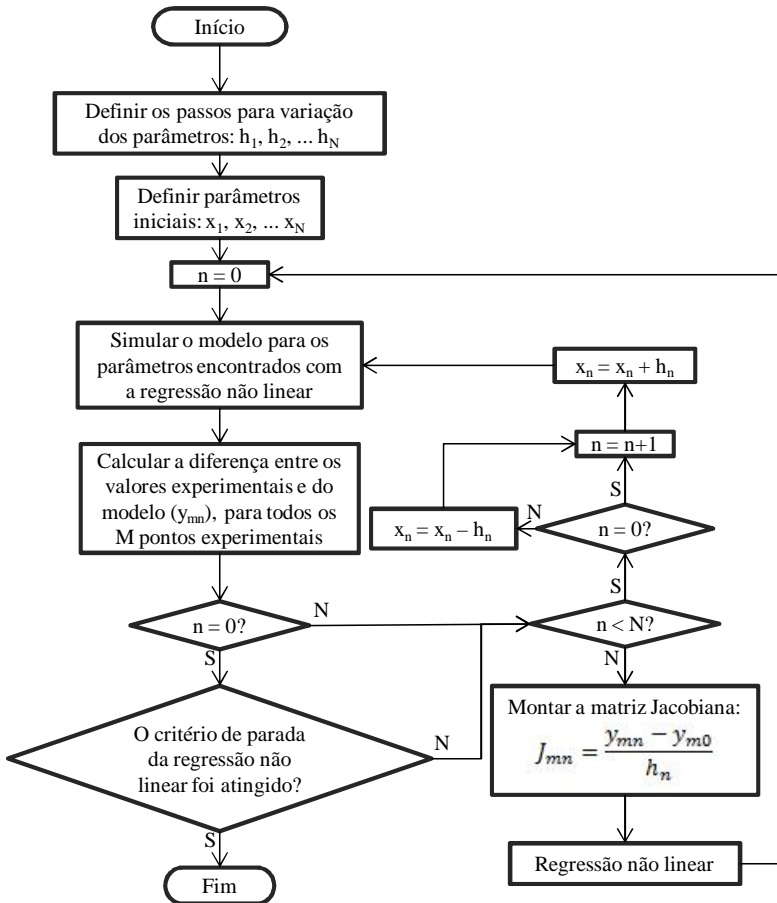
Para a solução de algoritmos de regressão não linear, é necessário calcular a matriz Jacobiana (J) da matriz que contem as equações com relação aos parâmetros que se deseja ajustar. Nos casos em que a solução analítica de uma equação não está disponível e deseja-se fazer a regressão, é necessário que o cálculo de J seja feito por aproximação numérica.

Para cada iteração, um conjunto de parâmetros é definido e o método numérico é utilizado para calcular a solução da equação. A solução é então comparada aos pontos a que se deseja ajustar a curva. Para cada parâmetro, o método numérico é novamente utilizado para calcular a solução da equação fazendo-se um ajuste com um passo h no valor do parâmetro em questão. J é então calculada fazendo-se

a diferença entre a solução com o ajuste h e a solução sem ajustes e dividindo-se o resultado pelo valor de h , o que corresponde à solução numérica da derivada parcial da equação em relação a um dos parâmetros.

Com a matriz Jacobiana montada, segue-se normalmente com a regressão não linear pelo método de escolha, por exemplo Gauss-Newton ou Levenberg-Marquardt. Um novo conjunto de parâmetros será calculado e assim inicia-se uma nova iteração, em que o processo de montagem da matriz deve ser repetido.

Figura 3 – Fluxograma para a montagem da matriz Jacobiana descrita na seção 2.4.1.



2.4.1 Montagem da matriz Jacobiana

Supõe-se que se deseja fazer um ajuste de curva de uma equação que não possui solução analítica a pontos experimentais. Os N parâmetros x_1, x_2, \dots, x_N são utilizados no algoritmo para resolver a equação numericamente. Os resultados desta solução são então comparados aos M pontos experimentais e esta diferença é apresentada como as saídas y_{mn} do algoritmo.

O primeiro passo é definir valores iniciais para os parâmetros e executar o algoritmo com eles.

$$(y_{10}, y_{20}, \dots, y_{M0}) = f(x_1, x_2, \dots, x_N) \quad (2.1)$$

Para cada um dos N parâmetros, o algoritmo deve ser novamente executado, somando-se ao parâmetro em questão um passo h .

$$(y_{11}, y_{21}, \dots, y_{M1}) = f(x_1 + h_1, x_2, \dots, x_N), \quad (2.2)$$

$$(y_{12}, y_{22}, \dots, y_{M2}) = f(x_1, x_2 + h_2, \dots, x_N), \quad (2.3)$$

...

$$(y_{1N}, y_{2N}, \dots, y_{MN}) = f(x_1, x_2, \dots, x_N + h_N) \quad (2.4)$$

A matriz J é então montada calculando-se a diferença entre a solução com o ajuste h e a solução sem ajustes e dividindo-se este resultado pelo valor de h .

$$J = \begin{bmatrix} \frac{y_{11}-y_{10}}{h_1} & \frac{y_{12}-y_{10}}{h_2} & \dots & \frac{y_{1N}-y_{10}}{h_N} \\ \frac{y_{21}-y_{20}}{h_1} & \frac{y_{22}-y_{20}}{h_2} & \dots & \frac{y_{2N}-y_{20}}{h_N} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \frac{y_{M1}-y_{M0}}{h_1} & \frac{y_{M2}-y_{M0}}{h_2} & \dots & \frac{y_{MN}-y_{M0}}{h_N} \end{bmatrix} \quad (2.5)$$

Neste trabalho, h_1, h_2, \dots, h_N são os parâmetros dos modelos, por exemplo a constante de adesão, a força dos pseudópodes e a taxa de proliferação. As saídas y_{mn} mostram as diferenças entre os valores do modelo matemático e dos pontos experimentais, para cada ponto experimental. Por fim, o método utilizado para a regressão não linear é o método Levenberg-Marquardt.

2.5 PROBLEMAS DE STEFAN

Problemas em que a solução de uma equação diferencial tem que satisfazer alguma condição na fronteira de um determinado domínio são conhecidos como problemas de valor de fronteira. Problemas em que se tem que determinar a posição desta fronteira, que varia no espaço e no tempo, são conhecidos como problemas de fronteira móvel, ou problemas de Stefan. Um dos exemplos clássicos de problema de fronteira móvel seria o do gelo derretendo. Neste problema, uma fonte de calor e colocada em uma extremidade de uma barra de gelo, a princípio a uma temperatura de 0°C , que passa a derreter conforme a temperatura se eleva. Há, portanto, a formação de uma fronteira, que separa a água em dois estados distintos: sólido e líquido. A posição no espaço desta fronteira varia no tempo segundo equações térmicas.

A dificuldade de solução deste tipo de problema com métodos usuais para soluções de equações parciais, como por exemplo, o método das diferenças finitas ou dos elementos finitos, está na determinação da posição da fronteira. Quando a solução é computada utilizando-se uma malha fixa de discretização, em geral a fronteira estará entre dois pontos discretizados, para qualquer instante no tempo (CRANK, 1984). Sendo assim, fórmulas e métodos especiais são necessários para uma determinação mais precisa da localização da fronteira. Alguns métodos para solução deste tipo de problema são: malha móvel, *level set* e campo de fases.

No método da malha móvel, o número de pontos entre um ponto fixo inicial e a fronteira móvel é mantido constante, por exemplo I . Sendo assim, a cada passo de tempo a malha é reajustada, fazendo com que a fronteira móvel esteja sempre no *Iésimo* ponto (CRANK, 1984). Dentre os três métodos existentes, este é o de mais simples implementação. No entanto, ele pode ser menos preciso que os outros dois para problemas com mais de uma dimensão (JAVIERRE *et al.*, 2006).

No método *level set*, uma fronteira de dimensão n é definida como o nível zero de uma função contínua de dimensão $n + 1$, que evolui de acordo com a velocidade v da fronteira (SETHIAN, 1996). Este método não é tão fácil de implementar quanto o método da malha móvel, mas apresenta vantagens quando o problema exige solução em mais dimensões (JAVIERRE *et al.*, 2006).

A formulação pelo método de campo de fases considera uma região de interface entre dois diferentes estados definidos, ao contrário dos dois métodos descritos anteriores, que consideram uma transição brusca entre os estados (JAVIERRE *et al.*, 2006).

3 MODELO BASEADO EM DIFUSÃO

Melanoma é um tipo de câncer de pele com origem dos melanócitos. Em sua fase vertical, o melanoma pode tornar-se metastático, o que piora o prognóstico de pacientes (BRESLOW, 1970). O desenvolvimento de metástases está relacionado à migração celular e trabalhos vêm sendo desenvolvidos para o estudo da influência de determinadas substâncias na migração de células de melanoma (ZHU *et al.*, 2004, 2002; CANTÓN *et al.*, 2003; REDPATH *et al.*, 2009; KATERINAKI *et al.*, 2006; MARQUES, 2010). Dentre eles, está o trabalho desenvolvido por MARQUES (2010), que teve como um de seus objetivos a investigação do efeito de agentes anti-inflamatórios não esteróides na redução da migração de células de melanoma. Ensaio do tipo *scratch wound* foram conduzidos para avaliação da migração das células pré-estimuladas pela citocina pró-inflamatória TNF- α e sob influência de agentes anti-inflamatórios não esteróides.

O objetivo deste estudo é desenvolver um modelo matemático para migração celular *in vitro* que possa ser quantitativamente validado com o modelo experimental de migração de células de melanoma. Para isto, uma equação será proposta com base em modelos de migração celular e invasão tumoral já existentes e os dados gerados serão posteriormente comparados aos resultados experimentais de migração de células de melanoma cutâneo humano em condições de controle apresentados por MARQUES (2010).

3.1 METODOLOGIA

Primeiramente, foi realizada uma adaptação de modelos matemáticos já existentes para a situação experimental com a qual se pretendia comparar os resultados (MARQUES, 2010), criando-se um modelo inicial. A partir da comparação dos resultados da simulação do modelo inicial com dados experimentais, foram propostas mudanças na equação do coeficiente de difusão do modelo inicial, como descrito nesta seção.

Modelo matemático - O modelo possui apenas uma variável, que é a concentração de células de melanoma, e se baseia nas seguintes suposições, considerando o protocolo experimental utilizado no estudo *in vitro*: (1) a proliferação e difusão das células são independentes da concentração de oxigênio, uma vez que a disponibilidade de oxigênio é

igual para todas as células e não é um fator limitante para as mesmas; (2) o coeficiente de difusão celular, que representa a movimentação da célula, aumenta com o aumento da densidade celular; (3) a morte celular é desconsiderada.

A variável c representa a concentração de células tumorais e varia no tempo segundo a equação:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \nabla \cdot (D_c \nabla c) + \alpha_c c \left(1 - \frac{c}{K_c}\right) \quad (3.1)$$

O primeiro termo do lado direito da Equação 3.1 representa a difusão das células. Foi considerada uma difusão segundo a Lei de Fick, semelhante a modelos apresentados por outros autores (ANDERSON *et al.*, 2000; ANDERSON, 2005; EIKENBERRY; THALHAUSER; KUANG, 2009; TOHYA *et al.*, 1998). Foi considerado um coeficiente de difusão dependente da concentração celular, como modelos apresentados por EIKENBERRY; THALHAUSER; KUANG (2009) e TOHYA *et al.* (1998). No entanto, para ajuste da curva aos dados experimentais, foi incluída uma constante d_2 , obtendo-se a Equação 3.2.

$$D_c = d_1 c + d_2, \quad (3.2)$$

em que d_1 e d_2 são constantes e positivas.

O segundo termo do lado direito da Equação 3.1 representa a proliferação celular, que foi modelada como um crescimento logístico, com uma taxa de crescimento *per capita* α_c . K_c é a densidade celular acima da qual a proliferação não acontece.

A equação foi resolvida considerando-se um sistema espacial de duas dimensões (x, y) , sendo a dimensão y unidimensional, $0 \leq x \leq X$ e $0 \leq t \leq T$.

No trabalho apresentado por MARQUES (2010), foi realizado um ensaio *scratch wound* para a avaliação da migração celular, em que uma região sem células é criada entre duas regiões com densidade celular maior do que zero. Diferentes condições iniciais foram utilizadas e os melhores resultados foram obtidos para as Equações 3.3 e 3.4.

$$c(x, y, 0) = c_0 \cdot e^{-4x^5}, \quad \text{para} \quad 0 \leq x \leq \frac{X}{2} \quad (3.3)$$

$$c(x, y, 0) = c_0 \cdot e^{-4(X-x)^5}, \quad \text{para} \quad \frac{X}{2} < x \leq X \quad (3.4)$$

As condições de contorno utilizadas foram:

$$\frac{\partial}{\partial x} c(0, y, t) = 0, \quad \text{para} \quad 0 \leq y \leq Y \quad (3.5)$$

$$\frac{\partial}{\partial x} c(X, y, t) = 0, \quad \text{para} \quad 0 \leq y \leq Y \quad (3.6)$$

$$\frac{\partial}{\partial y} c(x, 0, t) = 0, \quad \text{para} \quad 0 \leq x \leq X \quad (3.7)$$

$$\frac{\partial}{\partial y} c(x, Y, t) = 0, \quad \text{para} \quad 0 \leq x \leq X \quad (3.8)$$

Os valores de α_c e K_c escolhidos foram os mesmos utilizados no modelo desenvolvido por EIKENBERRY; THALHAUSER; KUANG (2009), respectivamente $0,17 \text{ dia}^{-1}$ e $5 \cdot 10^5 \text{ células mm}^{-2}$. No trabalho desenvolvido por TJIA; MOGHE (2002), são apresentados valores de coeficiente de difusão para queratinócitos que variam entre $0,002 \text{ mm}^2 \text{ dia}^{-1}$ e $0,07 \text{ mm}^2 \text{ dia}^{-1}$. Considerando que em sua concentração celular mínima as células de melanoma possuam um coeficiente de difusão nesta faixa, determinou-se o valor das constantes $d_1 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2 \text{ dia}^{-1} \text{ células}^{-1}$ e $d_2 = 0,014 \text{ mm}^2 \text{ dia}^{-1}$. A concentração inicial de células c_0 utilizada foi $5 \cdot 10^4 \text{ células mm}^{-2}$ (REDPATH *et al.*, 2009).

Dados experimentais - Os dados experimentais utilizados para validação do modelo foram retirados do trabalho desenvolvido por MARQUES (2010). Foram utilizados os dados de migração das células de melanoma cutâneo humano C8161 em meio de cultura controle. A linha celular foi obtida de metástases da parede abdominal, indicando esta ser uma linhagem de células de melanoma com alto poder invasivo (MARQUES, 2010).

As células de melanoma foram semeadas em placas de cultura de 12 poços em meio de cultura e foram incubadas por 3 dias em condições de cultura padrão. No terceiro dia, um ensaio de migração celular *scratch wound* foi realizado em cada poço utilizando-se uma ponta de pipeta plástica, formando um risco dividindo a área do poço em duas metades iguais, criando ao meio uma região sem células (MARQUES, 2010).

A redução da área sem células, *i.e.*, a distância entre as duas bordas de camada de células, em diferentes períodos de tempo (0, 2, 4, 8 e 24 horas) representaram a migração das células de melanoma. Foram obtidas medidas triplicadas para cada período num total de 6 experimentos. As imagens da migração das células de melanoma nos intervalos pré-determinados foram obtidas utilizando um microscópio e vídeo Apple MacIntosh, e software Open Lab 3.0.4 (MARQUES, 2010).

O Kroto Research Laboratory, laboratório onde os dados experimentais foram obtidos, possui uma licença Research Tissue Bank License (Human Tissue Authority License Number 12179). Todas as culturas de tecido deste trabalho experimental foram provenientes de pacientes que assinaram o formulário de consentimento (Research Consent Form) para que os tecidos fossem utilizados com propósito de pesquisa. Mais informações sobre a aprovação ética da pesquisa experimental, como os formulários citados acima, podem ser encontradas no trabalho de MARQUES.

Simulação - Foi desenvolvido um programa em linguagem C++ para a implementação do modelo. Discretização no espaço foi obtida com o método das diferenças centrais e discretização no tempo com o método numérico Runge Kutta de 4ª ordem. A solução apresentada na seção Resultados foi obtida para valores $X = 3mm$, $Y = 1mm$, $dx = 1\mu m$, $dy = 1mm$, $dt = 0,1s$ e $T = 24h$.

Comparação com dados experimentais - Para cada instante de tempo foi calculado o deslocamento máximo das células de melanoma $d_{mod}(t)$. Os resultados obtidos foram comparados com dados do estudo experimental. Para cada ponto experimental, foi calculado o erro com a seguinte fórmula:

$$E(t) = \frac{|d_{mod}(t) - d_{exp}(t)|}{d_{exp}(t)}, \quad (3.9)$$

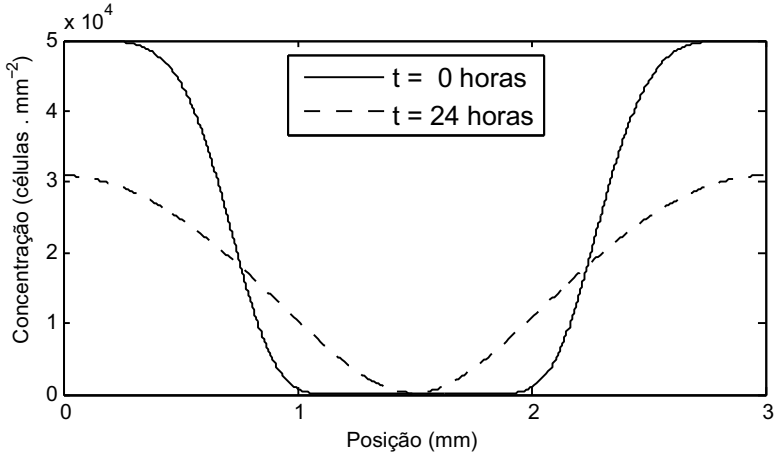
onde $d_{exp}(t)$ é o deslocamento para o instante t dos dados experimentais.

3.2 RESULTADOS

Para as concentrações utilizadas na simulação, o valor de coeficiente de difusão celular varia linearmente de $0,014mm^2 dia^{-1}$ a $1,014mm^2 dia^{-1}$.

A distribuição de concentração de células tumorais inicial possui valor máximo de $5 \cdot 10^4 \text{ células mm}^{-2}$ para $x = 0$ e $x = 3\text{mm}$, diminuindo em direção ao centro e apresentando um valor mínimo de $3 \cdot 10^{-9} \text{ células mm}^{-2}$ em $x = 1,5\text{mm}$. Após 24 horas de simulação, o perfil de distribuição de concentração muda, possuindo um máximo de $3,1 \cdot 10^4 \text{ células mm}^{-2}$ para $x = 0$ e $x = 3$, diminuindo em direção ao centro até o valor mínimo de $250 \text{ células mm}^{-2}$ em $x = 1,5\text{mm}$, como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 – Concentração celular (células mm^{-2}) em função da posição no eixo $x(\text{mm})$ no início ($t = 0h$) e ao final da simulação ($t = 24h$). Ao longo da simulação, a concentração celular nas bordas diminui e a concentração no centro aumenta, como resultado da difusão. Os melhores resultados foram obtidos para as condições iniciais apresentadas neste gráfico ($t = 0h$).

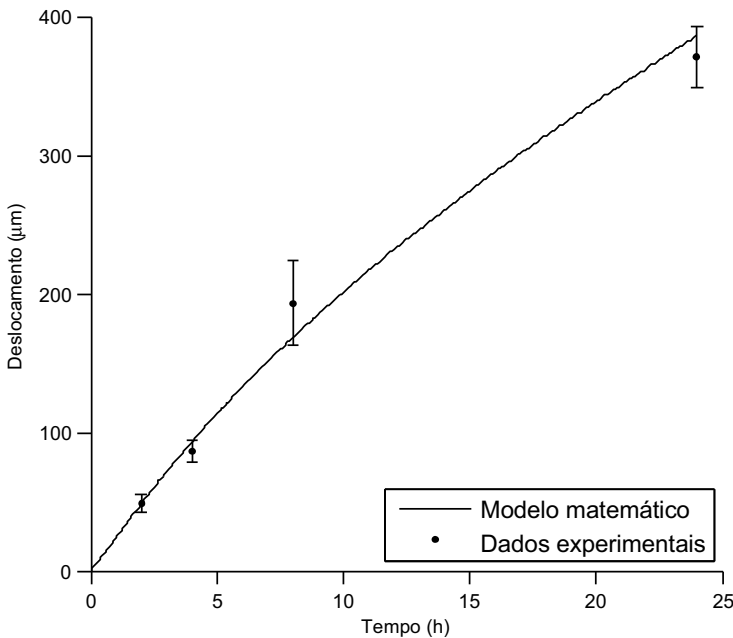


Na Figura 5, observa-se que o modelo matemático apresentou valores de deslocamento dentro do limite do desvio padrão para todos os pontos experimentais. O maior erro, de 13% foi observado em $t = 8h$, como pode ser observado na Tabela 1.

3.3 DISCUSSÃO

Neste estudo foi desenvolvido um modelo matemático de migração de células baseado em um estudo de migração de células de melanoma cutâneo humano *in vitro*. O modelo considera a proliferação e a difusão das células, que possui coeficiente variável em função da concentração celular.

Figura 5 – Migração das células de melanoma (μm) ao longo do tempo (horas) obtida com o modelo matemático proposto neste trabalho e experimentalmente no trabalho apresentado por MARQUES (2010). Os dados experimentais são apresentados como média \pm desvio padrão. Para todos os pontos, 2h 4h 8h e 24h, os valores do modelo matemático encontram-se dentro do desvio padrão dos dados experimentais.



EIKENBERRY; THALHAUSER; KUANG (2009) apresentam um modelo em que a morte celular é calculada como consequência de hipóxia. Considerando que o objetivo deste trabalho era validar o modelo ma-

temático com um experimento em que a presença de oxigênio é considerada abundante, a morte celular foi desconsiderada. Outros modelos matemáticos de invasão tumoral (ANDERSON *et al.*, 2000; ANDERSON, 2005; TOHYA *et al.*, 1998) também desconsideram a morte celular.

Tabela 1 – Erros dos valores do modelo matemático em relação aos dados experimentais. Os erros foram calculados para cada um dos pontos experimentais, com a Equação 3.9.

Tempo (h)	Erro
2	1,2%
4	7,9%
8	13,1%
24	4,1%

A Equação 3.1 mostra uma difusão por movimentação aleatória das células. Em outros modelos, como o apresentado por ANDERSON *et al.* (2000), a equação de difusão das células de câncer inclui, além da movimentação aleatória, uma movimentação direcionada à concentração de certos elementos químicos, ou haptotaxis. Como os dados experimentais utilizados neste trabalho são provenientes de um ensaio realizado apenas com células de melanoma, sem a presença de outros químicos, a haptotaxis foi desconsiderada e optou-se apenas pela difusão pela Lei de Fick com coeficiente de difusão dependente da concentração de células.

Outros modelos como os desenvolvidos por EIKENBERRY; THALHAUSER; KUANG (2009) e TOHYA *et al.* (1998) consideram o coeficiente de difusão dependente da disponibilidade de oxigênio. Os dados experimentais utilizados para comparação com o modelo desenvolvido neste trabalho, no entanto, são provenientes de um ensaio realizado apenas com células de melanoma *in vitro* em que a disponibilidade de oxigênio não era um fator limitante. Para a representação de migração de células de câncer em ambientes mais complexos, como por exemplo migração *in vivo*, seria necessária uma reavaliação da Equação 3.2, visando relacionar o coeficiente de migração celular com a disponibilidade de nutriente. No entanto, considerando-se o experimento utilizado para validação deste trabalho, a melhor forma de representar o protocolo experimental do estudo *in vitro* é desconsiderando-se a relação entre a disponibilidade de oxigênio e o coeficiente de difusão celular.

Foi utilizado um coeficiente de difusão para as células tumorais que aumenta linearmente com o aumento da concentração celu-

lar, semelhante a modelos como os desenvolvidos por EIKENBERRY; THALHAUSER; KUANG (2009) e TOHYA *et al.* (1998). Estudos sugerem, entretanto, que esta relação pode ser inversa. LYNNG; HARALDSETH; ROFSTAD (2000) demonstraram uma diminuição do coeficiente de difusão de células de melanoma com o aumento da concentração celular. As concentrações celulares utilizadas por LYNNG; HARALDSETH; ROFSTAD (2000) ($3 \cdot 10^5 \text{ células mm}^2$), no entanto, são maiores que a concentração máxima proposta pelo presente trabalho ($5 \cdot 10^4 \text{ células mm}^2$), não ficando claramente estabelecida uma relação entre o coeficiente de difusão e a densidade celular para valores de densidade abaixo dos utilizados por LYNNG; HARALDSETH; ROFSTAD (2000). Células de melanoma são células que migram de forma coletiva, o que mostra uma relação entre a migração e o contato célula-célula (FRIEDL; WOLF, 2003). Sendo assim, optou-se pela relação de aumento do coeficiente de mobilidade com o aumento da concentração celular, de forma semelhante a outros modelos matemáticos de migração de células de câncer de pele (EIKENBERRY; THALHAUSER; KUANG, 2009; TOHYA *et al.*, 1998).

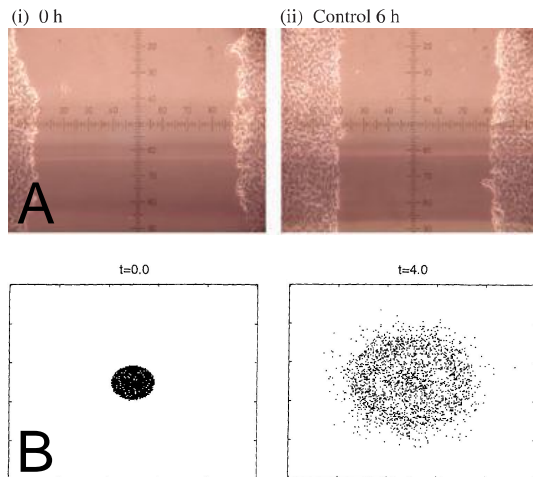
Neste trabalho, inclui-se a constante d_2 na Equação 3.2, o que permitiu um ajuste dos valores de migração da célula ao longo do tempo sem modificação significativa do formato da curva de migração. Com isto, foi obtida uma curva que melhor representou os dados experimentais utilizados neste trabalho. Outros valores foram testados para d_1 e d_2 que, no entanto, resultaram em erros maiores que os da Tabela 1. Outros estudos poderiam ser realizados para avaliação da influência do coeficiente de difusão na migração celular, bem como a variação do mesmo com a concentração de células.

Os valores de coeficiente de difusão apresentados neste trabalho ($0,01 \sim 1 \text{ mm}^2 \text{ dia}^{-1}$) são pequenos quando comparados a valores de coeficientes de difusão de células de melanoma obtidos experimentalmente por LYNNG; HARALDSETH; ROFSTAD (2000) ($50 \sim 80 \text{ mm}^2 \text{ dia}^{-1}$). No entanto, os valores deste trabalho são comparáveis a valores utilizados por outros modelos de migração de células de câncer, como os desenvolvidos por EIKENBERRY; THALHAUSER; KUANG (2009) ($0,002 \sim 0,07 \text{ mm}^2 \text{ dia}^{-1}$) e ANDERSON *et al.* (2000) ($\sim 0,0009 \text{ mm}^2 \text{ dia}^{-1}$). Este fato indica que a migração de células de melanoma não pode ser modelada considerando-se apenas a proliferação das células e um processo de difusão pela Lei de Fick. Outras forças devem ser estudadas para que se obtenham modelos com parâmetros semelhantes aos obtidos experimentalmente.

Uma possível explicação para esta diferença seria que o processo de difusão, modelado pela Lei de Fick, não considera a princípio a

migração coletiva das células. Células de melanoma apresentam predominantemente migração coletiva quando *in vitro* (FRIEDL; GILMOUR, 2009). Na migração coletiva, são observadas junções aderentes entre as células e a formação de pseudópodes é observada nas células da fronteira e não nas demais células da camada (FRIEDL; GILMOUR, 2009). Isto confere algumas características à migração, por exemplo: durante a migração as células não se separam das bordas e não há formação de buracos no meio da camada de células (MI *et al.*, 2007).

Figura 6 – Migração de células de câncer em situação experimental e em modelo matemático. **A:** Migração de células de melanoma em um ensaio *scratch wound*. Não se observa a formação de buracos no meio da camada de células. Retirado de (REDPATH *et al.*, 2009). **B:** Simulação da migração de células de câncer com um modelo baseado na Lei de Fick. Devido à difusão, as células se separam e pode-se observar a formação de buracos no meio da camada após algum tempo de simulação. Retirado de (ANDERSON *et al.*, 2000).



Inicialmente, optou-se por condições iniciais em que a concentração de células tumorais estava distribuída no espaço com formato degrau. Condições iniciais semelhantes, com variações abruptas de concentração na região de fronteira entre espaços com células e espaços sem células haviam sido utilizadas em outros trabalhos (EIKENBERRY; THALHAUSER; KUANG, 2009). No entanto, os melhores resultados de ajuste à curva dos valores experimentais foram obtidos neste trabalho

para condições iniciais com menor variação de concentração celular, como mostrado nas Equações 3.3 e 3.4. Estudos futuros podem ser realizados para avaliação da influência da variação da concentração de células inicial na migração celular para que se obtenha modelos que representem ainda melhor a migração celular *in vivo*.

A mudança observada na distribuição de concentração para $t = 0h$ e $t = 24h$, Figura 4, é qualitativamente comparável à variação na distribuição de concentrações apresentada por MAHESHWARI; LAUFFENBURGER (1998), porém difere da mudança observada por SENGERS; PLEASE; OREFFO (2007). No último, no entanto, é observado um aumento na concentração de células ao longo do tempo, diferentemente do visto na Figura 4, o que indica que no modelo desenvolvido por SENGERS; PLEASE; OREFFO (2007), a proliferação é mais significativa do que neste trabalho. Isto está ligado a fatores como o tipo de célula em estudo e poderia levar a uma diferente distribuição de concentração celular ao longo do tempo. A distribuição de concentração de células inicial, para $t = 0h$, apresentada na Figura 4 é qualitativamente comparável à apresentada por ANDERSON *et al.* (2000). A evolução da distribuição de concentração ao longo do tempo é diferente, no entanto, devido às diferenças de considerações feitas por ambos os modelos. No modelo apresentado por ANDERSON *et al.* (2000), são consideradas a MEC e enzimas que a degradam, bem como suas influências na movimentação das células.

A Figura 5 mostra que o modelo foi capaz de descrever a migração das células de melanoma como apresentado no estudo experimental do modelo de migração de melanoma de MARQUES (2010), uma vez que o valor encontrado pelo modelo encontra-se dentro do desvio padrão para todos os pontos experimentais e o maior erro encontrado, de 13%, ocorre para o ponto experimental de maior desvio padrão. Segundo o teste de Cramér von Mises, as curvas do modelo matemático e dos dados experimentais foram consideradas iguais, com $p < 0,006$. No entanto, os erros observados na Tabela 1 indicam que ainda há diferenças a serem consideradas entre o modelo matemático proposto e os dados obtidos experimentalmente.

O problema que se pretende resolver com o modelo proposto neste trabalho consiste em, a cada instante no tempo, localizar a posição da fronteira entre a região com células e a região sem células. Utilizando-se o método das diferenças centrais para discretização do espaço e tendo como única variável a concentração de células, a determinação da posição da fronteira torna-se inexata, o que pode ser responsável pelos erros apresentados na Tabela 1. Outros problemas

de fronteira móvel, em que a localização da fronteira é parte da solução como, por exemplo, os problemas conhecidos como Stefan problems (JAVIERRE *et al.*, 2006), propõe modelos numéricos diferentes para a solução, o que poderia ser aplicado ao modelo proposto neste trabalho na busca de melhores resultados.

Além disso, modelos como o desenvolvido por TOHYA *et al.* (1998) e ANDERSON *et al.* (2000) levam em consideração uma aleatoriedade na movimentação das células, o que foi desconsiderado no modelo proposto por este trabalho. A existência de alguma aleatoriedade na movimentação das células poderia aproximar os resultados obtidos dos resultados experimentais. Além disso, a relação com que o coeficiente de difusão varia com a concentração de células poderia ser avaliada em trabalhos experimentais futuros.

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um modelo matemático de migração de células de melanoma foi desenvolvido e posteriormente validado com dados experimentais, apresentando erro máximo de 13%. O modelo matemático proposto é capaz de representar a migração de células de melanoma observada experimentalmente quando se utiliza o coeficiente de difusão celular que varia linearmente com a concentração celular, como apresentado na Equação 3.2, e nas condições iniciais apresentada nas Equações 3.3 e 3.4. No entanto, comparações com resultados experimentais, por exemplo de coeficiente de difusão celular, mostram que o modelo ainda apresenta limitações. Uma das possibilidades para explicar estas diferenças seria que o modelo baseado em difusão não considera, a princípio, a migração coletiva observada em células de melanoma em estudos *in vitro*. Neste contexto, no Capítulo 4 será proposto o uso de um modelo de migração coletiva de células.

4 MODELO CONTÍNUO ELÁSTICO I

Grande parte dos modelos atuais de migração de células de câncer baseia-se em um processo de difusão (ANDERSON *et al.*, 2000; ANDERSON, 2005; EIKENBERRY; THALHAUSER; KUANG, 2009; TOHYA *et al.*, 1998). Estes trabalhos apresentam, em geral, uma variável principal: a concentração de células de câncer, que varia no tempo e no espaço de acordo com uma equação de difusão pela Lei de Fick, com coeficiente de difusão constante ou variável.

Sabe-se que o processo de migração de células depende da interação da célula com a MEC, através da formação de focos de adesão (LAUFFENBURGER; HORWITZ, 1996; FRIEDL; WOLF, 2003). Além disso, sabe-se também que o melanoma é um tipo de câncer que apresenta predominantemente migração coletiva (FRIEDL; WOLF, 2003), o que implica na existência de junções aderentes que promovem a adesão célula-célula (FRIEDL; GILMOUR, 2009). O processo de difusão não considera, a princípio, a existência destas ligações. Isto pode explicar as diferenças encontradas no trabalho apresentado por GALLINARO *et al.* (2012). Neste trabalho, a migração de células de melanoma foi modelada como um processo de difusão e os valores de coeficiente de difusão encontrados foram pequenos quando comparados a valores obtidos experimentalmente (GALLINARO *et al.*, 2012). Alguns modelos de migração buscam formas de incluir parâmetros no processo de difusão que representem as ligações célula-célula e célula-MEC, como foi feito no modelo proposto por CHAPLAIN (2011).

Já no trabalho apresentado por MI *et al.* (2007), um processo de cicatrização é representado por um modelo elástico contínuo. Este modelo é baseado em princípios de migração coletiva: durante a migração as células não se separam das bordas e não há formação de buracos no meio da camada de células. MI *et al.* (2007) propuseram um modelo matemático para a migração de enterócitos, durante processo de cicatrização, que considera que as células passam por processos de movimentação, deformação e proliferação.

O objetivo deste estudo é propor a utilização de um modelo matemático de migração celular coletiva, que possa ser quantitativamente comparado a dados experimentais e permita uma análise sobre a influência da citocina pró-inflamatória TNF- α na migração de células de melanoma.

4.1 METODOLOGIA

Modelo matemático - O modelo proposto por MI *et al.* (2007) é um modelo unidimensional que descreve a migração de uma camada celular após formação de uma fenda no meio da camada, como em um ensaio *scratch wound*. O modelo faz as seguintes considerações: (1) a camada possui apenas uma célula de profundidade, (2) existe uma ligação entre as células da camada, (3) após a criação da fenda (do ensaio *scratch wound*) surge uma força propulsora, proveniente da formação de pseudópodes nas células da fronteira que foi criada, (4) as células no interior da camada não formam pseudópodes e, portanto, não atuam diretamente na migração, (5) a camada de células pode sofrer deformação, movimentação e crescimento do material.

Para a formulação do modelo considera-se que, com a formação dos pseudópodes, é gerada uma força na fronteira da camada de células. Devido à adesão entre as células e a superfície, surge uma resistência ao deslizamento, que será incluída no problema através de uma constante de adesão. Uma taxa de crescimento é utilizada para levar em consideração a proliferação e morte celular. Seguindo as considerações apresentadas anteriormente e levando-se em consideração o balanço de momento, MI *et al.* (2007) demonstraram que a migração da camada de célula aconteceria segundo a equação:

$$\frac{\partial x}{\partial t} = \frac{k}{b} \frac{\partial^2 x}{\partial s^2} \left(\frac{\partial x}{\partial s} \right)^2, \quad (4.1)$$

em que s representa a posição de uma célula na camada original de células, $x(t, s)$ representa a posição da célula localizada em s na camada original no instante t , k é o módulo de elasticidade da camada de células e b é a constante de adesão da interação célula-superfície.

O gradiente de deformação (ε) é definido como:

$$\varepsilon = \frac{\partial x}{\partial \hat{s}} - 1, \quad (4.2)$$

em que $\hat{s}(t, s)$ é a posição hipotética da célula localizada em s na camada original de células no instante t , caso toda a deformação da camada fosse instantaneamente removida.

O crescimento material da camada foi descrito com uso do gradiente de crescimento $g(t, s) = \partial \hat{s} / \partial s$ na fórmula:

$$g(t, s) = e^{\rho t}, \quad (4.3)$$

em que ρ é a taxa de crescimento. .

Das Equações 4.2 e 4.3, temos que o gradiente de deformação pode ser calculado com:

$$\varepsilon = \frac{\partial x}{\partial s} e^{-\rho t} - 1 \quad (4.4)$$

As condições iniciais e de contorno utilizadas foram:

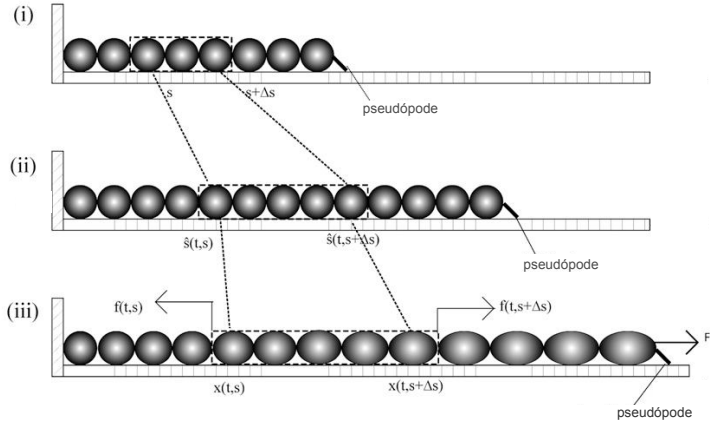
$$x(0, s) = 0, \quad \text{para } 0 \leq s \leq L, \quad (4.5)$$

$$x(t, 0) = 0, \quad \text{para } t \geq 0, \quad (4.6)$$

$$\frac{\partial x(t, 1)}{\partial s} = e^{(F/k) + \rho t}, \quad \text{para } t > 0, \quad (4.7)$$

em que F é a força de propulsão dos pseudópodes na fronteira de células após a criação da fenda.

Figura 7 – Representação esquemática da camada de células em repouso (i), no instante t somente devido à proliferação (ii) e devido à proliferação e à deformação (iii). Retirado de (MI *et al.*, 2007).



Calibração - Foi realizada uma regressão não linear pelo método dos mínimos quadrados, utilizando-se o algoritmo Levenberg-Marquardt, para calibração do modelo e determinação dos parâmetros. As constantes do problema k , b e F aparecem apenas nas divisões $\kappa = k/b$ e

$\varphi = F/k$. Portanto, a regressão foi realizada para as constantes κ , φ e ρ .

Os dados experimentais utilizados para calibração foram retirados do trabalho apresentado por REDPATH *et al.* (2009). Foram utilizados os dados de migração das células da linha C8161 de melanoma cutâneo humano, em meio de cultura controle e sob influência da citocina pró-inflamatória TNF- α . A linha celular C8161 foi obtida de metástases da parede abdominal, indicando esta ser uma linhagem de células de melanoma com alto poder invasivo.

As células de melanoma foram semeadas em placas de cultura em meio de cultura a uma concentração $4 \cdot 10^4$ células ml^{-1} por poço e foram incubadas por 1 dia em condições de cultura padrão. No segundo dia, o meio de cultura foi retirado e então um novo meio de cultura suplementado com TNF- α à 800 U/ml foi adicionado. No terceiro dia, um ensaio de migração celular *scratch wound* foi realizado em cada poço utilizando-se uma ponta de pipeta plástica, formando um risco dividindo a área do poço em duas metades iguais, criando ao meio uma região sem células. A redução da área sem células *i.e.* a distância entre as duas bordas de camada de células, em diferentes períodos de tempo (0, 2, 4, 6 e 8 horas) representaram a migração das células de melanoma.

O Kroto Research Laboratory, laboratório onde os dados experimentais foram obtidos, possui uma licença Research Tissue Bank License (Human Tissue Authority License Number 12179). Todas as culturas de tecido deste trabalho experimental foram provenientes de pacientes que assinaram o formulário de consentimento (Research Consent Form) para que os tecidos fossem utilizados com propósito de pesquisa. Mais informações sobre a aprovação ética da pesquisa experimental, como os formulários citados acima, podem ser encontradas no trabalho de MARQUES (2010).

Simulação - Um script foi escrito em MATLAB para implementação do modelo. Discretização do tempo e do espaço foi obtida com o método das diferenças finitas (MI *et al.*, 2007). Para definição dos passos de tempo e espaço, foi utilizada a metodologia proposta por SMITH; WEAVER (2012), considerando-se um erro menor a 2% para os limites desta simulação. Os passos de tempo (dt) e espaço (ds) utilizados foram, respectivamente, $1/120h$ e $0,0125\mu m$.

SMITH; WEAVER (2012) propõe uma metodologia para analisar a influência do erro de discretização nos resultados encontrados com o seu modelo matemático, para um caso em que a solução analítica

das equações do modelo não está disponível. Para isso, um resultado obtido com uma discretização extremamente pequena (tão pequena que seria impraticável usá-la em sistemas de duas ou três dimensões) é estabelecido como referência. É feita então uma comparação entre a referência e resultados obtidos com discretizações mais razoáveis. É estabelecido assim um erro máximo para os limites, no tempo e no espaço, da simulação realizada.

4.2 RESULTADOS

Para os dados da linha de célula C8161 na situação controle e sob influência do TNF- α , as curvas obtidas pelo modelo matemático após regressão não linear apresentaram, respectivamente, coeficientes de determinação $R^2 = 0,89$ e $R^2 = 0,92$. Os valores das constantes obtidos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores das constantes κ (razão entre o módulo de elasticidade k e a constante de adesão b), φ (razão entre a força dos pseudópodos F e o módulo de elasticidade k) e a taxa de proliferação ρ obtidos durante calibração do modelo, feita com os dados experimentais apresentados por REDPATH *et al.* (2009).

Constantes	Controle	TNF- α
$\kappa = k/b[\mu m^2 h^{-1}]$	104,59	219,92
$\varphi = F/k[adimensional]$	0,096	0,13
$\rho[h^{-1}]$	0,91	0,86

Os valores de constantes apresentados na Tabela 2 foram utilizados para estudo da influência da proliferação e da deformação no deslocamento final das células nas situações controle e com TNF- α . Os resultados podem ser observados na Figura 9.

A Figura 10 mostra a influência da constante de adesão na migração, para dois valores de proliferação, considerando-se o módulo de elasticidade constante.

Uma simulação foi realizada para avaliar a influência da proliferação e da deformação na migração celular, através do estudo do gradiente de deformação (Figura 11). A compressão foi relacionada à proliferação, devido ao aumento no número de células na camada, e a extensão foi relacionada à deformação, devido à tensão aplicada pelas células da fronteira.

Figura 8 – Curva obtida com a simulação do modelo matemático após regressão não linear com os dados da linha de célula C8161 em situação controle (A), com $R^2 = 0,89$, e TNF- α (B), com $R^2 = 0,92$. Os dados experimentais são apresentados como média \pm desvio padrão, $n = 7$.

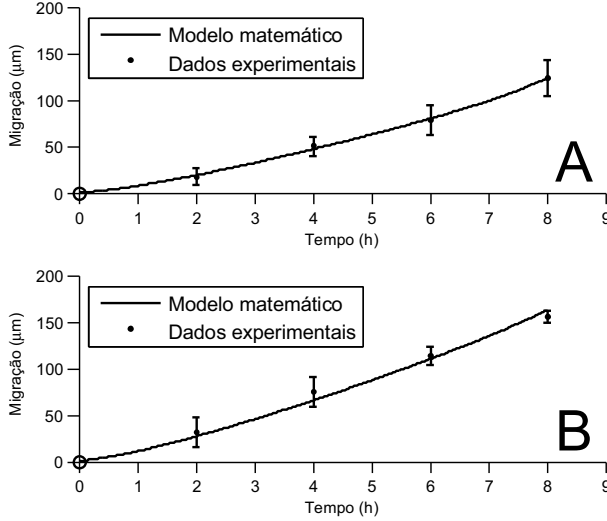


Figura 9 – Simulação do modelo obtida para a situação hipotética em que o deslocamento ocorresse exclusivamente devido à deformação. Os valores de κ (razão entre o módulo de elasticidade k e a constante de adesão b) e φ (razão entre a força dos pseudópodes F e o módulo de elasticidade k) utilizados são os apresentados na Tabela 2. A taxa de proliferação $\rho = 0 \text{ h}^{-1}$ para as duas situações: controle e TNF- α .

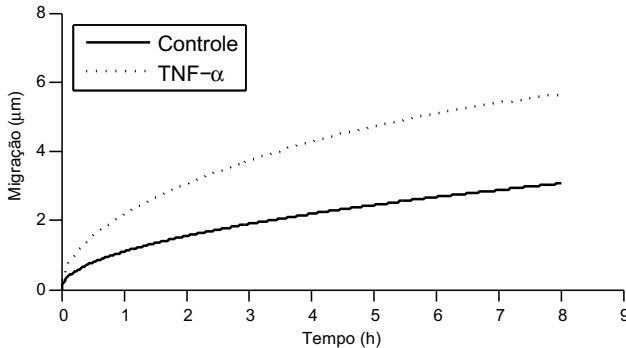
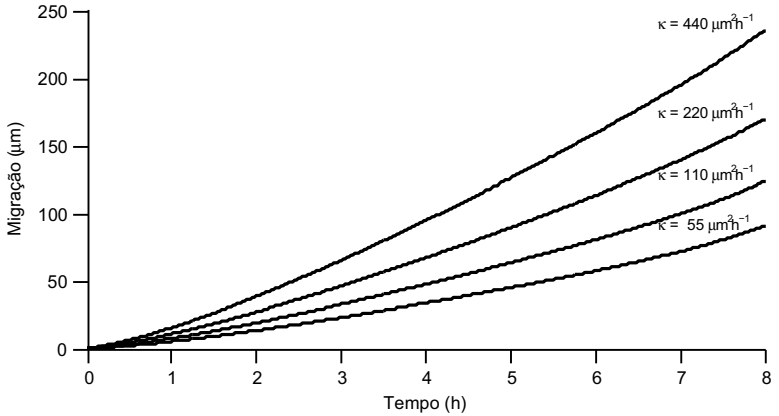


Figura 10 – Migração celular para diferentes valores de κ (razão entre o módulo de elasticidade k e a constante de adesão b). Para esta simulação, $\varphi = 0,1$ (razão entre a força dos pseudópodes F e o módulo de elasticidade k) e taxa de proliferação $\rho = 0,9 \text{ h}^{-1}$. Considerando-se o módulo de elasticidade constante, a migração celular diminui com o aumento da adesão. Os valores de κ mostrados no gráficos tem unidade $\mu\text{m}^2 \text{ h}^{-1}$

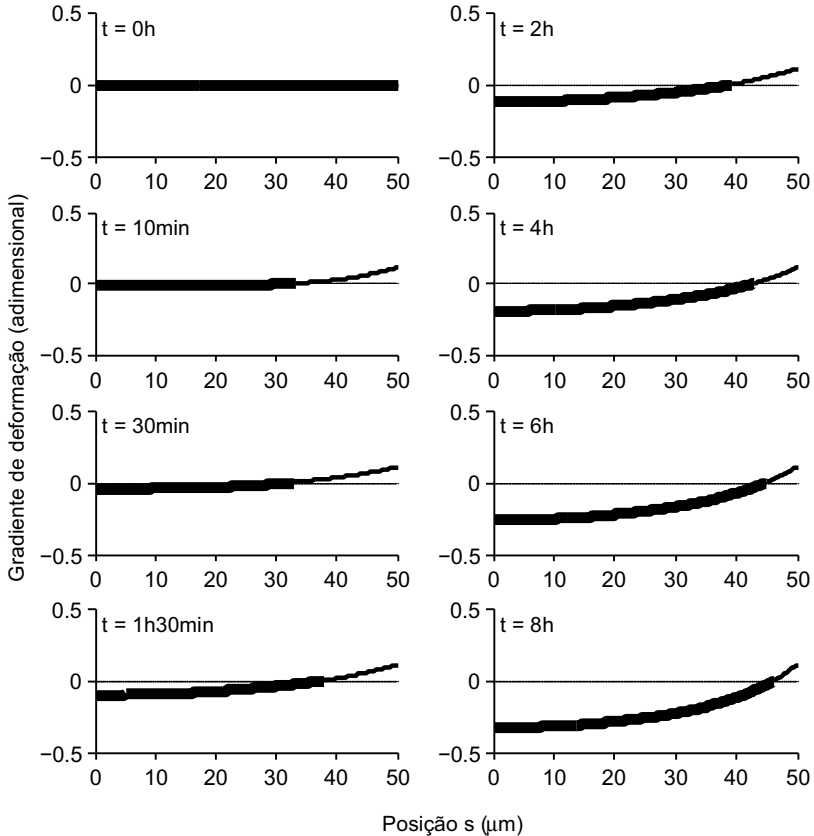


4.3 DISCUSSÃO

Um modelo de migração coletiva de células (MI *et al.*, 2007) foi utilizado para simular a migração de células de melanoma em um ensaio do tipo *scratch wound*. O modelo foi calibrado com dados experimentais (REDPATH *et al.*, 2009). Estes dados experimentais foram obtidos em um ensaio realizado com a linha de célula C8161, em situação controle e sob influência do TNF- α .

Modelos de migração celular baseados em difusão têm sido utilizados para a modelagem de migração de células de câncer (ANDERSON *et al.*, 2000; ANDERSON, 2005; EIKENBERRY; THALHAUSER; KUANG, 2009; TOHYA *et al.*, 1998). No entanto, os valores de coeficiente de difusão apresentados por alguns destes modelos como, por exemplo, os modelos propostos por EIKENBERRY; THALHAUSER; KUANG (2009) e ANDERSON *et al.* (2000), são pequenos ($0,0009 \text{ mm}^2 \text{ dia}^{-1} \sim 0,07 \text{ mm}^2 \text{ dia}^{-1}$) quando comparados aos valores de coeficiente de di-

Figura 11 – Gradiente de deformação das células em função da sua posição na camada original em diferentes instantes de tempo. Linhas grossas e finas indicam respectivamente células em compressão e extensão, exceto no instante $t = 0$, em que as células encontram-se em repouso. Nos instantes iniciais (coluna da esquerda), a movimentação é dominada pela deformação, causando extensão nas células próximas à fronteira. Em momentos posteriores (coluna da direita), a movimentação passa a ser dominada pela proliferação, aumentando a compressão na camada como um todo. Para esta simulação, razão entre a força dos pseudópodes F e o módulo de elasticidade k $\varphi = 0,1$, razão entre o módulo de elasticidade k e a constante de adesão b $\kappa = 440 \mu\text{m}^2 \text{h}^{-1}$ e taxa de proliferação $\rho = 0,1 \text{h}^{-1}$.



fusão para células de melanoma obtidos experimentalmente por LYNG; HARALDSETH; ROFSTAD (2000) ($50 \sim 80 \text{ mm}^2 \text{ dia}^{-1}$). Uma possível explicação para a diferença seria o fato dos modelos não considerarem a migração coletiva, no caso das células de melanoma. O modelo elástico contínuo, proposto por MI *et al.* (2007), leva em consideração aspectos da migração coletiva e apresenta uma opção válida para ensaios do tipo *scratch wound*.

Os valores obtidos na calibração são apresentados na Tabela 2. Como os parâmetros de interesse k , b e F aparecem no modelo apenas nas divisões $\kappa = k/b$ e $\varphi = F/k$, a regressão não linear foi realizada para κ e φ . No entanto, tendo-se um valor referência de um dos três parâmetros de interesse, é possível estimar o valor dos outros dois. MI *et al.* (2007) modelaram a migração de enterócitos no processo de cicatrização e apresentaram um valor de módulo de elasticidade k de aproximadamente 44 nN . Considerando-se que as células de melanoma migrando no ensaio apresentem um módulo de elasticidade semelhante a esse, a camada de células teria, na situação controle, força de propulsão dos pseudópodes F de aproximadamente $4,22 \text{ nN}$ e constante de adesão b de aproximadamente $0,42 \text{ h nN } \mu\text{m}^{-2}$. ZHU *et al.* (2002) mostraram que uma maior expressão de integrinas é observada em células de melanoma na presença de TNF- α . Ao relacionar a migração celular com a concentração de integrinas, MI *et al.* (2007) discutem que o módulo de elasticidade da camada de células deve ser independente da concentração de integrinas. Sendo assim, considerando-se que as células de melanoma migrando no ensaio sob influência do TNF- α apresentem um módulo de elasticidade k semelhante ao do ensaio controle, a camada de células teria força de propulsão dos pseudópodes F de aproximadamente $5,72 \text{ nN}$ e constante de adesão b de aproximadamente $0,2 \text{ h nN } \mu\text{m}^{-2}$.

Na literatura, encontram-se valores de força que variam de $0,5 \text{ nN}$ a 85 nN , de acordo com o método utilizado para a medição e o local da célula em que a força foi medida (ANANTHAKRISHNAN; EHRLICHER, 2007; BRUNNER *et al.*, 2006; PRASS *et al.*, 2006). Além disso, o aumento da força observado na presença do TNF- α em relação à situação controle também está de acordo com o esperado. Sabe-se que a força com que a célula propulSIONA-se depende das ligações da mesma à superfície sobre a qual ela se movimenta e que esta ligação é realizada por moléculas de adesão como, por exemplo, as integrinas (LAUFFENBURGER; HORWITZ, 1996; ANANTHAKRISHNAN; EHRLICHER, 2007).

Os valores da constante de adesão encontrados nas duas situações são da mesma ordem de grandeza dos apresentados por MI *et al.*

(2007) (aproximadamente $0,11 \text{ h nN } \mu\text{m}^{-2}$). No entanto, ao contrário do esperado, foi observada uma redução na constante de adesão após a introdução do TNF- α . A citocina TNF- α está associada a um aumento na expressão de integrinas, que aumenta a adesão celular (ZHU *et al.*, 2002). Portanto, seria esperado que o valor da constante de adesão aumentasse com a introdução do TNF- α , o que não ocorreu. Uma hipótese para explicar esta divergência seria que o módulo de elasticidade não fosse independente da concentração de TNF- α . Baseado nas considerações feitas por MI *et al.* (2007) em seu trabalho, considerou-se que o módulo de elasticidade permaneceria igual após a introdução do TNF- α . No entanto, caso o módulo de elasticidade aumentasse com o TNF- α , a constante de adesão também aumentaria.

Um estudo foi realizado para uma análise da influência da constante de adesão na migração celular. Para este estudo, simulou-se a migração celular para diferentes valores da constante κ . Os resultados podem ser vistos na Figura 10. Considerando-se que o módulo de elasticidade da camada seja o mesmo para todas as simulações, uma diminuição da constante κ corresponde a um aumento na adesão das células à superfície. Os resultados mostraram que um aumento da adesão das células à superfície implica em uma diminuição na migração. No entanto, ZHU *et al.* (2002) mostraram que um aumento na adesão levaria a um aumento na migração, o que não está de acordo com estes resultados. Mais uma vez, uma hipótese para explicar esta divergência seria que o módulo de elasticidade não fosse independente da concentração de TNF- α . Por outro lado, estes resultados podem estar de acordo com outro modelo matemático, proposto por DIMILLA; BARBEE; LAUFFENBURGER (1991), que mostrou uma curva em formato de sino para a relação velocidade de migração x adesão. Isto é, o aumento da adesão levaria a um aumento na velocidade de migração até certo valor, a partir do qual a velocidade estabilizaria, para voltar a diminuir com o aumento da adesão. Sendo assim, os valores apresentados na Figura 10 estariam localizados na seção do gráfico em que o aumento da adesão implica em diminuição da velocidade de migração.

Como as constantes k , b e F aparecem no problema apenas nas razões $\kappa = k/b$ e $\varphi = F/k$, a regressão para estimar os parâmetros foi realizada para as constantes κ , φ e ρ . Portanto, para fazer a análise das constantes k , b e F é necessário estabelecer o valor de uma delas, para que os outros possam ser estimados. A discussão anterior sobre a constante de adesão considera que o módulo de elasticidade não é alterado quando a concentração de integrinas aumenta, como sugerido por MI *et al.* (2007), e isto pode alterar matematicamente os resultados

a respeito da constante de adesão. Se o modelo matemático permitisse que a regressão fosse realizada diretamente para as constantes k , b e F , não seria necessário assumir previamente nada em relação a alteração do módulo de elasticidade. Neste caso, o papel do TNF- α na adesão e da adesão na migração, segundo o modelo proposto, poderiam ser discutidos mais precisamente.

A Tabela 2 mostra que houve uma redução na taxa de crescimento com a introdução do TNF- α . O papel do TNF- α na proliferação das células de câncer ainda é paradoxal (ANDERSON; NAKADA; DEWITTE, 2004). Nos resultados apresentados neste trabalho, a taxa de proliferação das células de melanoma diminuiu com a introdução do TNF- α . KUNINAKA *et al.* (2000) mostraram que a adição de TNF- α inibiu o crescimento das células tumorais e MARQUES (2010) observou uma redução na viabilidade das células C8161 tratadas com TNF- α . No modelo proposto neste trabalho, a taxa de proliferação leva em consideração tanto o aumento quanto a diminuição no número de células da população. Portanto, os resultados estão de acordo com os mostrados por KUNINAKA *et al.* (2000) e MARQUES (2010), já que tanto a inibição do crescimento quanto a redução da viabilidade das células levariam a uma diminuição da taxa de proliferação. Mesmo com uma taxa de proliferação menor que a da situação controle, a migração observada nas células tratadas com o TNF- α foi maior devido à maior deformação observada na Figura 9,

Como observado na Figura 11, a migração é, no início, mais dependente da deformação, passando a ser mais dependente da proliferação com o passar do tempo. Isto ocorre pois, como observado na Equação 4.7, a migração da fronteira da camada de células varia exponencialmente com um termo constante (F/k) e com um termo da taxa de proliferação (ρt). Para instantes iniciais, a influência do termo ρt é menor, passando a aumentar com o tempo. A taxa de proliferação constante confere à migração um formato diferente dos observado em ensaios *scratch wound*. Em alguns destes ensaios, o formato da curva de migração é de saturação (BESHIR *et al.*, 2010; DEBEIR *et al.*, 2008; MARQUES, 2010), o que não está de acordo com o formato observado nas Figuras 8 e 10. Trabalhos sugerem que a taxa de proliferação em ensaios do tipo *scratch wound* pode variar, tanto com o tempo, como com a localização na camada de células (MI *et al.*, 2007). Sendo assim, mais estudos poderiam ser feitos para determinar se a taxa de proliferação constante no tempo é de fato a mais adequada para este tipo de ensaio. Esta poderia ser uma outra hipótese para as diferenças encontradas entre o modelo e os resultados experimentais discutidas

anteriormente.

Embora o método numérico utilizado para solução do modelo tenha sido o proposto por MI *et al.* (2007) e os resultados estarem de acordo com valores encontrados na literatura, como discutido anteriormente, é importante que se faça uma análise da influência da discretização utilizada nos resultados obtidos. A análise foi realizada seguindo-se a metodologia proposta por SMITH; WEAVER (2012) e, para os limites desta simulação, apresentados na Metodologia, o maior erro encontrado foi de menos de 2% na curva de migração.

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um modelo de migração coletiva de células foi utilizado para simular a migração de células de melanoma em um ensaio do tipo *scratch wound*. O modelo leva em consideração aspectos da migração coletiva de células, como a adesão entre as células da camada, o que não é o caso para a maior parte dos modelos de crescimento tumoral atuais baseados em processos de difusão. Com algumas exceções, grande parte dos modelos de crescimento tumoral são não-dimensionais e, portanto, não permitem que uma análise quantitativa dos resultados seja feita. Neste estudo, um modelo dimensional foi implementado e calibrado com base em dados experimentais, resultando em parâmetros que tem valores comparáveis a trabalhos experimentais, na maior parte dos casos. As maiores diferenças encontradas, envolvendo a constante de adesão e a migração em células tratadas com TNF- α , podem estar relacionadas ao próprio modelo matematico ou à taxa de proliferação utilizada. Uma análise mais profunda da taxa de proliferação e um modelo que permitisse uma regressão diretamente da constante de adesão poderiam trazer mais ideias a respeito das diferenças encontradas. Sendo assim, no Capítulo 5 será proposta uma alteração no modelo, para que uma taxa de proliferação variável no tempo possa ser utilizada, permitindo novas comparações.

5 MODELO CONTÍNUO ELÁSTICO II

O Capítulo 4 deste trabalho propõe o uso de um modelo contínuo elástico para a simulação da migração de células de melanoma em um ensaio *scratch wound*. Este modelo possui, entre outros parâmetros, uma taxa de proliferação considerada constante. No entanto, trabalhos sugerem que a taxa de proliferação em ensaios do tipo *scratch wound* pode variar, tanto com o tempo como com a localização na camada de células (MI *et al.*, 2007).

O objetivo deste estudo é propor uma alteração no modelo contínuo elástico do Capítulo 4, tornando possível a inclusão de uma taxa de proliferação variável no tempo. Uma equação será proposta para representar a variação da taxa de proliferação sugerida por MI *et al.* (2007) e os resultados obtidos serão comparados com dados experimentais.

5.1 METODOLOGIA

Modelo matemático - O modelo proposto por MI *et al.* (2007) é um modelo unidimensional que descreve a migração de uma camada celular após formação de uma fenda no meio da camada, como em um ensaio *scratch wound*. O modelo faz as seguintes considerações: (1) a camada possui apenas uma célula de profundidade, (2) existe uma ligação entre as células da camada, (3) após a criação da fenda (do ensaio *scratch wound*) surge uma força propulsora, proveniente da formação de pseudópodes nas células da fronteira que foi criada, (4) as células no interior da camada não formam pseudópodes e, portanto, não atuam diretamente na migração, (5) a camada de células pode sofrer deformação, movimentação e crescimento material. Seguindo as considerações apresentadas anteriormente, MI *et al.* (2007) demonstram que a migração da camada de célula aconteceria segundo a equação:

$$\frac{\partial x}{\partial t} = \frac{k}{b} \left(\frac{\partial x}{\partial s} \right)^{-1} \frac{\partial}{\partial s} \left(\ln \left(\frac{\partial x}{\partial s} \right) - \ln \left(\frac{\partial \hat{s}}{\partial s} \right) \right) \quad (5.1)$$

em que x representa a posição da fronteira da camada de células, k é o módulo de elasticidade da camada de células, b é a constante de adesão da interação célula-superfície, s representa a posição de uma célula na camada original de células e \hat{s} representa a posição da célula no caso hipotético em que nenhuma deformação ocorresse e toda a migração se desse exclusivamente devido à proliferação.

Para determinação da relação $\partial\hat{s}/\partial s$, MI *et al.* (2007) propõe o uso do gradiente de crescimento $g(t, s) = \partial\hat{s}/\partial s$, que obedece

$$\frac{\partial g(t, s)}{\partial t} = \rho g(t, s) \quad (5.2)$$

em que ρ é a taxa de crescimento.

A partir deste ponto, MI *et al.* (2007) assumem que a taxa de crescimento não varia no tempo. No entanto, esta taxa pode, segundo estudos, variar com o tempo e com a localização no espaço (MI *et al.*, 2007). Sendo assim, neste trabalho optou-se por modelar o gradiente de crescimento considerando-se uma taxa de crescimento invariável no espaço, como proposto por MI *et al.* (2007) e variável no tempo. Fazendo-se esta consideração, a solução da Equação 5.2 com condição inicial $g(0, s) = 1$ pode ser obtida como

$$g(t, s) = e^{\int \rho(t) dt} \quad (5.3)$$

Das equações 5.1 e 5.3, obtém-se a equação:

$$\frac{\partial x}{\partial t} = \frac{k}{b} \frac{\partial^2 x}{\partial s^2} \left(\frac{\partial x}{\partial s} \right)^{-2} \quad (5.4)$$

O gradiente de deformação (ϵ) é definido como:

$$\epsilon = \frac{\partial x}{\partial \hat{s}} - 1 \quad (5.5)$$

Da Equação 5.5, é possível obter:

$$\epsilon = \frac{\partial x}{\partial t} \frac{\partial t}{\partial \hat{s}} - 1 \quad (5.6)$$

Resolvendo a Equação 5.6 para $\partial\hat{s}/\partial t$, temos que o deslocamento da fronteira de células em função do tempo, na situação hipotética em que nenhuma deformação ocorresse, pode ser obtido com a Equação 5.7.

$$\frac{\partial \hat{s}}{\partial t} = (\epsilon + 1)^{-1} \frac{\partial x}{\partial t} \quad (5.7)$$

As condições iniciais e de contorno, com as devidas alterações da taxa de crescimento variável no tempo, são:

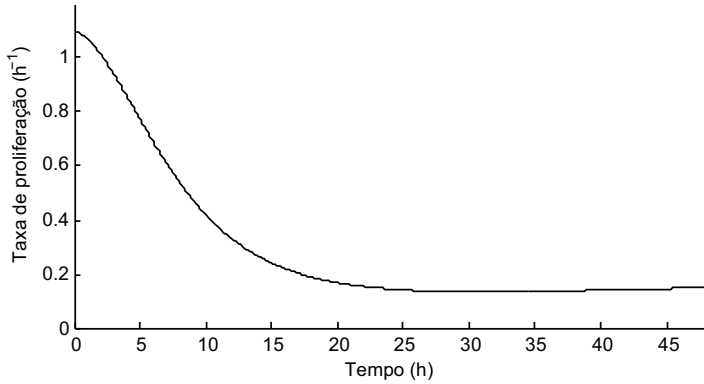
$$x(0, s) = 0, \quad \text{para } 0 \leq s \leq L, \quad (5.8)$$

$$x(t, 0) = 0, \quad \text{para } t \geq 0, \quad (5.9)$$

$$\frac{\partial x(t, 1)}{\partial s} = e^{(F/k) + \int \rho(t) dt}, \quad \text{para } t > 0, \quad (5.10)$$

em que L é a largura da camada inicial de células.

Figura 12 – Comportamento genérico da taxa de proliferação proposta. Ela inicia em um valor mais alto, reduz ao longo do experimento e estabiliza em um valor menor.



Há indícios de que a proliferação das células pode ser maior pouco tempo após a criação de fendas (MI *et al.*, 2007), como no ensaio *scratch wound*. Sendo assim, optou-se por modelar a taxa de crescimento das células com um valor inicial alto, correspondendo ao início do experimento *scratch wound*, que diminuísse com o tempo, estabilizando em um valor de taxa de crescimento menor que o inicial. Este comportamento pode ser observado na Figura 12, que possui equação matemática:

$$\rho(t) = \frac{k_3^{k_2} t^{k_2} (k_1 k_2 + k_1 + 2k_4) + (k_1 + k_4) t^{2k_2} + k_4 k_3^{2k_2}}{\left(k_3^{k_2} + t^{k_2}\right)^2} \quad (5.11)$$

em que k_1 , k_2 , k_3 e k_4 são constantes.

Calibração - Foi realizada uma regressão não linear pelo método dos mínimos quadrados, utilizando-se o algoritmo Levenberg-Marquardt, para calibração do modelo e determinação dos parâmetros. As constantes do problema k , b e F aparecem apenas nas divisões $\kappa = k/b$ e $\varphi = F/k$. Portanto, a regressão foi realizada para as constantes κ , φ , k_1 , k_2 , k_3 e k_4 .

Os dados experimentais utilizados para validação do modelo foram retirados do trabalho desenvolvido por MARQUES (2010). Foram utilizados os dados de migração das células de três linhas diferentes de melanoma cutâneo humano: HBL, A375SM e C8161, em meio de cultura controle e sob influência da citocina pró-inflamatória TNF- α . A linha celular HBL foi obtida de uma metástase do nódulo linfático de um melanoma nodular. A linha celular A375 foi obtida em cultura de uma metástase do nódulo linfático. Uma variante de alto poder invasivo (A375-SM) foi obtida de uma metástase pulmonar produzida por células A375 crescendo subcutaneamente em ratos. A linha celular C8161 foi obtida de metástases da parede abdominal, indicando esta ser uma linhagem de células de melanoma com alto poder invasivo.

As células de melanoma foram semeadas em placas de cultura de 12 poços em meio de cultura a uma concentração $1 \cdot 10^5$ células/ml por poço e foram incubadas por 3 dias em condições de cultura padrão. No segundo dia, o meio de cultura foi retirado e foi então adicionado um novo meio de cultura suplementado com TNF- α à 300 U/ml. No terceiro dia, um ensaio de migração celular *scratch wound* foi realizado em cada poço utilizando-se uma ponta de pipeta plástica, formando um risco dividindo a área do poço em duas metades iguais, criando ao meio uma região sem células.

A redução da área sem células *i.e.* a distância entre as duas bordas de camada de células, em diferentes períodos de tempo (0, 2, 4, 8 e 24 horas) representaram a migração das células de melanoma.

O Kroto Research Laboratory, laboratório onde os dados experimentais foram obtidos, possui uma licença Research Tissue Bank License (Human Tissue Authority License Number 12179). Todas as culturas de tecido deste trabalho experimental foram provenientes de pacientes que assinaram o formulário de consentimento (Research Consent Form) para que os tecidos fossem utilizados com propósito de pesquisa. Mais informações sobre a aprovação ética da pesquisa experimental, como os formulários citados acima, podem ser encontradas no trabalho de MARQUES (2010).

Simulação - Um script foi escrito em MATLAB para implemen-

tação do modelo. Discretização do tempo e do espaço foi obtida com o método das diferenças finitas (MI *et al.*, 2007). Para a discretização, utilizou-se os valores definidos no Capítulo 4.

5.2 RESULTADOS

Para os dados das linhas de célula HBL, A375SM e C8161, na situação controle e sob influência do TNF- α , as curvas obtidas pelo modelo matemático após regressão não linear apresentaram os coeficientes de determinação apresentados na Tabela 3. Os valores das constantes obtidos com a regressão encontram-se na Tabela 4.

Tabela 3 – Valores dos coeficientes de determinação (R^2) obtidos durante a regressão não linear para as linhas de célula HBL, A375SM e C8161, nas situações controle e com TNF- α .

	HBL		A375SM		C8161	
	Cont.	TNF- α	Cont.	TNF- α	Cont.	TNF- α
R^2	0,7573	0,6493	0,8435	0,9741	0,9475	0,9966

Com as constantes k_1 , k_2 , k_3 e k_4 , obtidas com a regressão e apresentadas na Tabela 4, obtiveram-se as curvas da taxa de proliferação em função do tempo, para as três linhas de células, na situação controle e sob influência do TNF- α . Estas curvas podem ser observadas na Figura 14.

Utilizando-se os valores de κ e φ apresentados na Tabela 4, foram realizadas simulações para as três linhas de célula, na situação controle e sob influência do TNF- α , em dois diferentes cenários: (i) migração exclusivamente devido à deformação, utilizando-se um valor de taxa de proliferação nulo; (ii) migração exclusivamente devido à proliferação, utilizando-se a Equação 5.7. O resultado deste estudo pode ser observado na Figura 15.

5.3 DISCUSSÃO

Um modelo de migração coletiva de células foi utilizado para simular a migração de células de melanoma em um ensaio *scratch wound*. O modelo possui como parâmetros a constante de adesão das células à superfície, o módulo de elasticidade da camada de células e uma taxa

Figura 13 – Curva obtida com a simulação do modelo matemático após regressão não linear com os dados das linhas de célula HBL, A375SM e C8161 em situação controle e TNF- α . Os dados experimentais são apresentados como média \pm desvio padrão, $n = 7$.

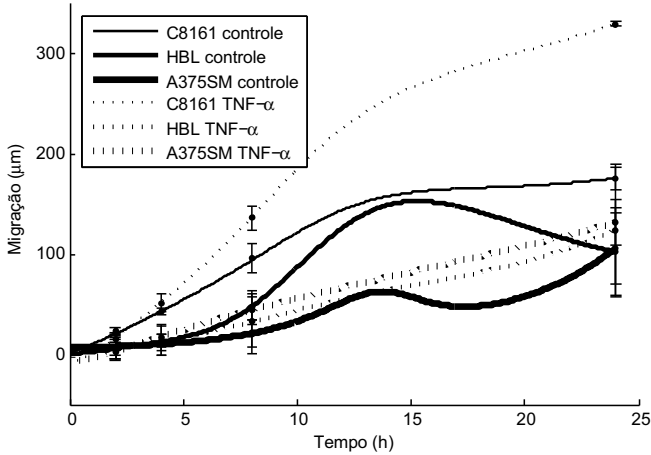
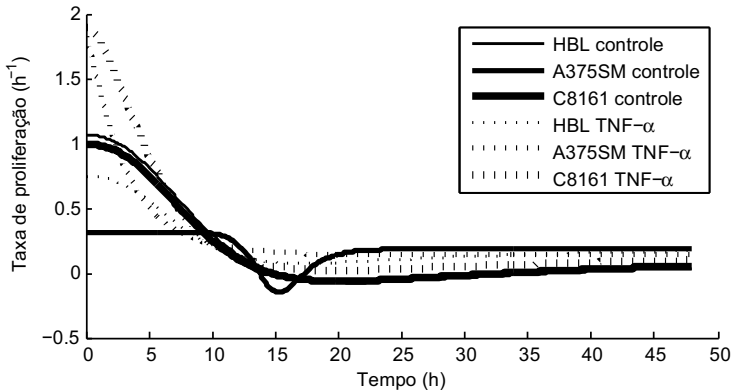


Tabela 4 – Valores das constantes κ (razão entre o módulo de elasticidade k e a constante de adesão b), φ (razão entre a força dos pseudópodes F e o módulo de elasticidade k) e constantes da taxa de proliferação k_1 , k_2 , k_3 e k_4 obtidos durante calibração do modelo, feita com os dados experimentais apresentados por MARQUES (2010) para as linhas de célula HBL, A375SM e C8161, nas situações controle e com TNF- α .

	HBL		A375SM		C8161	
	Cont	TNF- α	Cont	TNF- α	Cont	TNF- α
$\kappa = k/b$ [$\mu m^2 h^{-1}$]	3,63	3,92	0,63	32,32	54,48	89,32
$\varphi = F/k$ [<i>adim.</i>]	0,92	2,24	4,45	-1,58	0,78	-1,16
k_1 [h^{-1}]	0,96	0,56	0,13	1,65	0,88	1,74
k_2 [<i>adim.</i>]	-2,30	-2,42	-12,28	-1,29	-2,36	-1,74
k_3 [h]	14,28	12,02	15,14	5,48	13,78	9,50
k_4 [h^{-1}]	0,10	0,19	0,19	0,17	0,11	0,16

de proliferação variável no tempo. Uma regressão não linear pelo método dos mínimos quadrados foi realizada para calibração do modelo e determinação dos parâmetros para as linhas de célula HBL, A375SM e C8161, em situação controle e com adição do TNF- α .

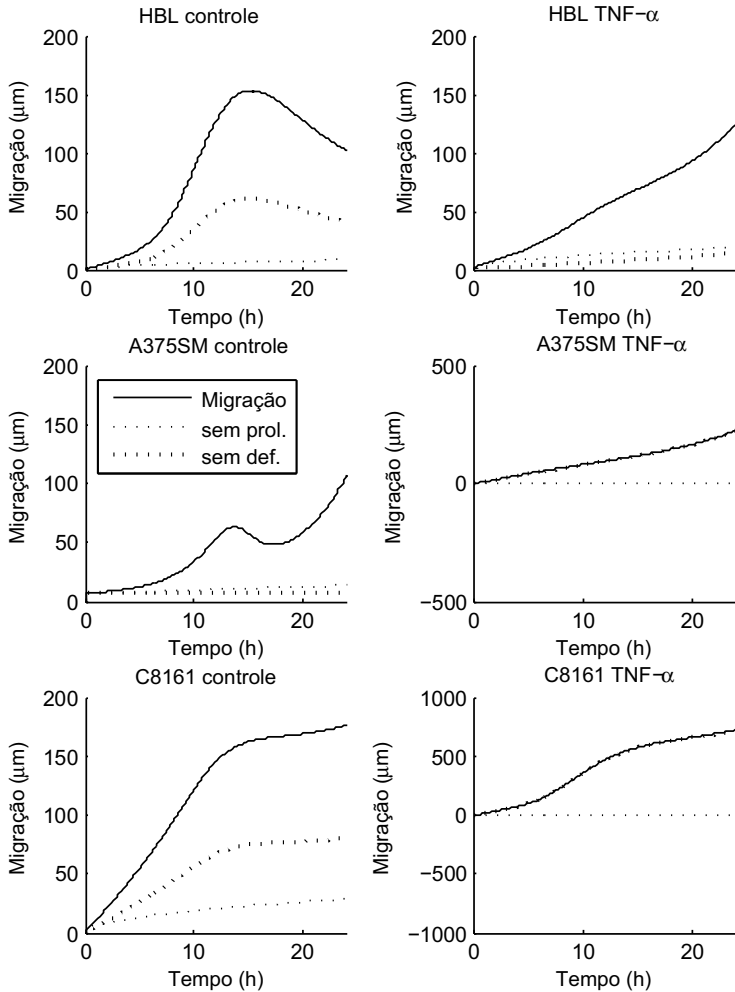
Figura 14 – Taxa de proliferação das linhas de células HBL, A375SM e C8161, em situação controle e com TNF- α . Foram utilizadas as constantes da taxa de proliferação k_1 , k_2 , k_3 e k_4 apresentadas na Tabela 4 na Equação 5.11.



Considerando-se um módulo de elasticidade constante, nas situações com e sem TNF- α , de 44 nN , como proposto por MI *et al.* (2007), a linha de célula HBL apresentaria constante de adesão de $11\text{ h nN } \mu\text{m}^{-2}$. Já a linha de célula A375SM apresentaria constante de adesão de $70\text{ h nN } \mu\text{m}^{-2}$ na situação controle e de $1,4\text{ h nN } \mu\text{m}^{-2}$ com TNF- α . A linha de célula C8161 teria constante de adesão de $0,8\text{ h nN } \mu\text{m}^{-2}$ na situação controle e de $0,5\text{ h nN } \mu\text{m}^{-2}$ com TNF- α . Com exceção da linha C8161, as outras duas apresentam valores altos quando comparados aos encontrados por MI *et al.* (2007) e no Capítulo 4 deste trabalho. Para as três linhas de célula, a constante de adesão diminuiu com a introdução do TNF- α , o que não está de acordo com o esperado, já que a introdução do TNF- α está associada a uma maior expressão de integrinas (ZHU *et al.*, 2002).

Considerando-se ainda um módulo de elasticidade constante e igual a 44 nN , a linha de célula HBL apresentaria valores de força de propulsão entre os encontrados na literatura ($0,5\text{ nN}$ a 85 nN (ANANTHAKRISHNAN; EHRLICHER, 2007; BRUNNER *et al.*, 2006; PRASS *et al.*, 2006)).

Figura 15 – Migração das células com os parâmetros da Tabela 4, considerando-se que não houve proliferação (valores da Tabela 4, com exceção da taxa de proliferação ρ , que foi substituído por 0) e considerando-se que não houve deformação (parâmetros da Tabela 4 utilizados na Equação 5.7). Os valores negativos de φ (razão entre a força dos pseudópodes F e o módulo de elasticidade k) foram substituídos por 0.



Além disso, o comportamento esperado com a introdução do TNF- α seria observado, já que a força aumentou com a introdução do mesmo. As duas linhas de célula mais invasivas, no entanto, apresentaram um comportamento diferente do esperado, em relação à força. Para as duas células, o valor da força diminuiu com a introdução do TNF- α . Além disso, considerando-se um módulo de elasticidade necessariamente positivo, a força de propulsão das duas linhas de célula seria negativa após introdução do TNF- α . Isto significaria que a força resultante da formação dos pseudópodes seria criada na direção contrária à fenda do ensaio *scratch wound*. Neste caso, a migração se daria pela proliferação das células, que estariam comprimidas ao longo de todo o experimento devido à força contrária ao sentido da migração. Isto não está de acordo com o proposto pela modelagem de MI *et al.* (2007), que tem a força propulsora como uma das responsáveis pela migração no sentido de abertura da fenda.

Diferentemente do modelo proposto originalmente por MI *et al.* (2007), optou-se por utilizar uma taxa de crescimento variável no tempo, já que estudos indicam que esta pode ser maior no momento de criação da fenda do ensaio *scratch wound* (MI *et al.*, 2007). Devido a esta alteração, o formato da curva de migração, de saturação, se assemelha ao formato observado em outros ensaios *scratch wound* (BESHIR *et al.*, 2010; DEBEIR *et al.*, 2008; MARQUES, 2010). Com a taxa de crescimento constante, o formato observado é exponencial, como pode ser observado no Capítulo 4. A equação utilizada para a taxa de crescimento foi definida de forma que a taxa fosse maior no início, diminuindo ao longo do tempo de ensaio e finalmente estabilizando em um valor menor que o inicial. Após estabilização, o valor da taxa de proliferação é o valor da constante k_4 . Para todas as situações estudadas, os valores de taxa de proliferação variam entre $0,1 \text{ dia}^{-1}$ e $0,2 \text{ dia}^{-1}$. Para as células mais invasivas (A375SM e C8161), a introdução do TNF- α aumentou a proliferação nos instantes iniciais, após criação da fenda, em relação à situação controle. A constante k_3 está associada ao tempo de transição entre a maior e a menor taxa de proliferação. Para todas as situações estudadas, ela diminuiu com a introdução do TNF- α , sendo a diminuição mais significativa para a linha de célula A375SM. MI *et al.* (2007) sugerem que a taxa de proliferação pode variar também no espaço, e não só no tempo, o que levaria a resultados diferentes dos encontrados neste trabalho.

Um estudo foi realizado para análise da influência da deformação e da proliferação na migração. Os valores das constantes utilizados foram os obtidos na Tabela 4, com exceção da força de propulsão para

as linhas de célula A375SM e C8161. Neste caso, optou-se por utilizar um valor de força propulsora de $0\ nN$, devido aos motivos apresentados anteriormente. Para a célula HBL, a migração sofre maior influência da proliferação na situação controle, passando a uma situação mais equilibrada com adição do TNF- α . Para as linhas de célula A375SM e C8161 com TNF- α , a migração é determinada apenas pela proliferação, devido à força de propulsão dos pseudópodes de $0\ nN$.

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A migração de três linhas de célula de melanoma foi simulada com uso de um modelo matemático de migração celular coletiva. O modelo propõe uma taxa de proliferação variável no tempo, como proposto por outros trabalhos. De uma forma qualitativa, a taxa de proliferação variável confere à curva um formato mais parecido a formatos obtidos experimentalmente. No entanto, os valores obtidos com a regressão mostram que ainda há diferenças entre o modelo e os dados experimentais a serem consideradas.

6 DISCUSSÃO

Três modelos matemáticos diferentes foram utilizados para simular a migração de células de melanoma. O primeiro foi um modelo baseado em difusão, como a maior parte dos modelos de migração celular encontrados na literatura. O segundo foi um modelo contínuo elástico, elaborado para células durante um ensaio *scratch wound*. O último modelo foi uma alteração do modelo contínuo elástico, considerando-se uma taxa de proliferação variável no tempo.

A princípio, os modelos baseados em difusão não consideram a migração coletiva das células de melanoma, o que pode explicar diferenças encontradas entre os coeficientes de difusão de células de câncer obtidos experimentalmente e os utilizados em modelos matemáticos deste tipo. Já o modelo contínuo elástico foi desenvolvido considerando-se a migração coletiva de células durante um ensaio *scratch wound*. Apesar de permitir análises quantitativas dos resultados, não é possível comparar os valores de todos os parâmetros com valores obtidos experimentalmente. Alguns parâmetros, como o módulo de elasticidade da camada de células, foram comparados com valores de outros modelos matemáticos e não valores experimentais, o que dificulta a interpretação dos resultados. Além disso, alguns de seus parâmetros só podem ser obtidos na forma de razões com outros parâmetros, o que também dificulta a interpretação dos resultados. Uma formulação diferente, que permitisse a obtenção de cada parâmetro isolado, traria novas questões a respeito dos resultados encontrados.

Apesar de formular a migração considerando-se a coletividade, o modelo contínuo elástico apresenta alguns valores diferentes de valores obtidos em outros trabalhos. Além disso, a variação encontrada na maior parte dos parâmetros com a introdução do TNF- α foi diferente do esperado de acordo com a literatura. A Tabela 5 mostra que há diferenças inclusive entre os resultados apresentados nos Capítulos 4 e 5 deste trabalho, apesar dos dois estudos terem sido realizados com o modelo contínuo elástico. As concentrações de TNF- α nos estudos dos Capítulos 4 e 5 são, respectivamente, 800 U/ml e 300 U/ml. Esta diferença, no entanto, não deve ser responsável pelas inconsistências nos resultados, uma vez que REDPATH *et al.* (2009) mostraram que não houve diferença significativa na migração de células de melanoma tratadas com TNF- α a concentrações entre 300 U/ml e 1000 U/ml.

Apesar de algumas inconsistências, os estudos apresentados nos Capítulos 4 e 5 deste trabalho apresentaram um resultado comum. De-

Tabela 5 – Variação nos parâmetros do modelo contínuo elástico após a introdução do TNF- α para taxa de proliferação variável e constante. O sinal + indica aumento e - diminuição no valor do parâmetro após a introdução do TNF- α . Para a taxa de proliferação ρ variável, considerou-se o valor do parâmetro no início do ensaio. Menos invasiva é a célula HBL e mais invasivas as células A375SM e C8161.

	$\rho = \text{constante}$	$\rho = f(t)$	
		Menos invasiva	Mais invasivas
κ	+	+	+
ϕ	+	+	-
ρ	-	-	+

vido à formulação do modelo contínuo elástico, o aumento da constante de adesão leva a uma diminuição da migração da camada de células. O modelo matemático apresentado por DIMILLA; BARBEE; LAUFFENBURGER (1991) mostra uma curva em formato de sino para a relação entre a velocidade de migração e a adesão celular. Neste caso, o modelo contínuo elástico poderia representar a migração na parte do gráfico em que o aumento da adesão leva a diminuição da velocidade de migração celular. No entanto, o estudo apresentado por ZHU *et al.* (2002), realizado com células de melanoma em um ensaio *scratch wound*, mostrou que um aumento na adesão levaria a um aumento na migração. Neste caso, o modelo seria incapaz de descrever a situação obtida experimentalmente, tanto com a taxa de proliferação constante, quanto com a taxa de proliferação variável apresentada no Capítulo 5. Mudanças no equacionamento do modelo contínuo elástico poderiam ser realizadas de forma a incorporar a situação em que o aumento da constante de adesão leva a um aumento na migração das células.

Uma taxa de proliferação variável no tempo foi utilizada no estudo do Capítulo 5, como sugerido por MI *et al.* (2007). Neste caso, optou-se por uma taxa que fosse maior no início e diminuísse até estabilizar em um valor menor, baseado em indícios de que a proliferação pode ser maior logo após a criação da fenda do ensaio *scratch wound* (MI *et al.*, 2007). O formato da curva de migração resultante se assemelha mais aos formatos obtidos experimentalmente do que quando a taxa de proliferação constante é utilizada. No entanto, ainda existem diferenças dos parâmetros em relação a parâmetros obtidos em outros trabalhos que devem ser consideradas. Outras variações da taxa de proliferação poderiam ser estudadas. Um exemplo seria fazer a taxa

de proliferação variável no espaço. Outra possibilidade seria relacionar a variação da taxa no tempo ou no espaço com a variação de outras variáveis do problema, por exemplo o gradiente de deformação da camada. MI *et al.* (2007) comentaram que a taxa pode ser maior na região próxima à fenda logo após a criação da mesma. Um estudo sobre como relacionar fisicamente a taxa de proliferação à localização da camada, por exemplo utilizando-se o gradiente de deformação, poderia ser realizado para atrelar a variação da taxa de proliferação à variação de outro parâmetro do modelo.

Alguns modelos utilizam como base as equações de difusão, mas fazem considerações para que a adesão célula-célula e a adesão célula-MEC sejam consideradas. Este é o caso do modelo proposto por CHAPLAIN (2011). Apesar do modelo contínuo elástico levar em consideração a coletividade da migração na sua formulação, seus resultados apresentam diferenças em relação a estudos experimentais. Modelos que sejam baseados em difusão e façam considerações para simular migrações coletivas podem ser uma alternativa com melhores resultados. No entanto, faltam ainda estudos quantitativos que façam a comparação com resultados experimentais.

No Capítulo 3, a migração é considerada exclusivamente individual, enquanto que nos Capítulos 4 e 5 ela é considerada exclusivamente coletiva. No entanto, existe uma possibilidade de que estas células apresentem tipos de migração distintos em momentos ou localização no espaço diferentes. Estudos sobre a migração individual e coletiva de células falam sobre a plasticidade da migração, isto é, a transição de um tipo de migração para outro (FRIEDL, 2004; FRIEDL; GILMOUR, 2009). Sendo assim, poderia-se estudar o desenvolvimento de modelos híbridos, que permitissem que o mesmo grupo de células apresentasse diferentes tipos de migração. Modelos como este poderiam explicar parte das diferenças encontradas neste trabalho e trazer *insights* sobre a plasticidade da migração celular.

7 CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS

Modelos matemáticos de crescimento tumoral e migração celular podem auxiliar no diagnóstico e tratamento de diversos tipos de câncer. Apesar de muito trabalho já ter sido desenvolvido nesta área, ainda há questões a serem resolvidas antes que os modelos possam ser utilizados de forma confiável em aplicações clínicas, por exemplo, na programação de cirurgia para remoção de melanomas.

Neste trabalho, foram apresentados três modelos de migração celular para comparação com dados experimentais de células de melanoma. No Capítulo 3, um modelo baseado na Lei de Fick foi utilizado. Considerações foram feitas a respeito da distribuição da concentração de células no início do ensaio, já que poucos estudos apresentam resultados conclusivos sobre esta distribuição. Os resultados mostraram que a migração de células de melanoma não pode ser modelada considerando-se apenas a proliferação das células e um processo de difusão.

No Capítulo 4, foi proposta a utilização de um modelo contínuo elástico baseado em princípios de migração coletiva de células. Os resultados obtidos mostraram uma relação entre a adesão e a migração das células diferente do esperado biologicamente. No Capítulo 5, uma alteração foi realizada no modelo do Capítulo 4 para permitir uma taxa de proliferação variável no tempo. Mesmo com esta alteração, os resultados continuaram apresentando diferenças em relação ao esperado biologicamente para a relação entre a adesão e a migração de células. Sendo assim, conclui-se que esta diferença deve ocorrer devido ao equacionamento do modelo matemático e propõe-se um estudo da influência da constante de adesão na migração das células, para posterior adaptação do modelo.

Com base no concluído neste trabalho, seguem algumas sugestões de trabalhos futuros:

- Estudo e modelagem da distribuição da concentração de células no momento inicial e ao longo do tempo durante ensaios *scratch wound*;
- Estudo e modelagem da variação da taxa de proliferação no espaço e no tempo, para células de câncer, em ensaios *scratch wound*;
- Estudo sobre a influência da constante de adesão nos resultados do modelo contínuo elástico, visando uma proposta de alteração

do modelo para que o mesmo seja capaz de representar os resultados experimentais de migração de células de melanoma.

- Modelagem matemática de migração celular que permita transição entre migração individual e coletiva.

REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts and Figures 2011*. 2011.

AMERICAN CANCER SOCIETY. *Melanoma Skin Cancer*. 2012.

ANANTHAKRISHNAN, R.; EHRLICHER, A. The forces behind cell movement. *International journal of biological sciences*, Ivyspring International Publisher, v. 3, n. 5, p. 303, 2007.

ANDERSON, A. A hybrid mathematical model of solid tumour invasion: the importance of cell adhesion. *Mathematical Medicine and Biology*, IMA, v. 22, n. 2, p. 163–186, 2005.

ANDERSON, A. *et al.* Mathematical modelling of tumour invasion and metastasis. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, Hindawi Publishing Corporation, v. 2, n. 2, p. 129–154, 2000.

ANDERSON, A.; QUARANTA, V. Integrative mathematical oncology. *Nature Reviews Cancer*, Nature Publishing Group, v. 8, n. 3, p. 227–234, 2008.

ANDERSON, G.; NAKADA, M.; DEWITTE, M. Tumor necrosis factor- α in the pathogenesis and treatment of cancer. *Current opinion in pharmacology*, Elsevier, v. 4, n. 4, p. 314–320, 2004.

BESHIR, A. *et al.* Raf kinase inhibitor protein suppresses nuclear factor- κ b-dependent cancer cell invasion through negative regulation of matrix metalloproteinase expression. *Cancer letters*, Elsevier, v. 299, n. 2, p. 137–149, 2010.

BRESLOW, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of surgery*, Lippincott, Williams, and Wilkins, v. 172, n. 5, p. 902, 1970.

BRUNNER, C. *et al.* Cell migration through small gaps. *European Biophysics Journal*, Springer, v. 35, n. 8, p. 713–719, 2006.

CANTÓN, I. *et al.* Tumor necrosis factor α increases and α -melanocyte-stimulating hormone reduces uveal melanoma invasion through fibronectin. *Journal of investigative dermatology*, Nature Publishing Group, v. 121, n. 3, p. 557–563, 2003.

CHAPLAIN, M. Multiscale mathematical modelling in biology and medicine. *IMA Journal of Applied Mathematics*, IMA, v. 76, n. 3, p. 371–388, 2011.

CIARLETTA, P.; FORET, L.; AMAR, M. The radial growth phase of malignant melanoma: multi-phase modelling, numerical simulations and linear stability analysis. *Journal of The Royal Society Interface*, The Royal Society, v. 8, n. 56, p. 345–368, 2011.

CRANK, J. *Free and moving boundary problems*. [S.l.]: Oxford University Press, 1984.

DEBEIR, O. *et al.* Videomicroscopic extraction of specific information on cell proliferation and migration in vitro. *Experimental cell research*, Elsevier Science, v. 314, n. 16, p. 2985–2998, 2008.

DIMILLA, P.; BARBEE, K.; LAUFFENBURGER, D. Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 60, n. 1, p. 15–37, 1991.

EIKENBERRY, S.; THALHAUSER, C.; KUANG, Y. Tumor-immune interaction, surgical treatment, and cancer recurrence in a mathematical model of melanoma. *PLoS computational biology*, Public Library of Science, v. 5, n. 4, p. e1000362, 2009.

FRIEDL, P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Current opinion in cell biology*, Elsevier, v. 16, n. 1, p. 14–23, 2004.

FRIEDL, P.; GILMOUR, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Nature Publishing Group, v. 10, n. 7, p. 445–457, 2009.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 5, p. 362–374, 2003.

GALLINARO, J. V. *et al.* Modelo matemático de migração *in vitro* de células de melanoma. In: *XXIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*. [S.l.: s.n.], 2012. p. 383–387.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 2007.

JAVIERRE, E. *et al.* A comparison of numerical models for one-dimensional stefan problems. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, Elsevier, v. 192, n. 2, p. 445–459, 2006.

KATERINAKI, E. *et al.* Sodium salicylate inhibits tnf-[alpha]-induced nf-[kappa] b activation, cell migration, invasion and icam-1 expression in human melanoma cells. *Melanoma research*, v. 16, n. 1, p. 11, 2006.

KUNINAKA, S. *et al.* Direct influences of pro-inflammatory cytokines (il-1beta tnf-alpha, il-6) on the proliferation and cell-surface antigen expression of cancer cells. *Cytokine*, v. 12, n. 1, p. 8 – 11, 2000.

KUNISHIGE, J.; BRODLAND, D.; ZITELLI, J. Surgical margins for melanoma in situ. *Journal of the American Academy of Dermatology*, Elsevier, 2011.

LAUFFENBURGER, D.; HORWITZ, A. Cell migration: Review a physically integrated molecular process. *Cell*, v. 84, p. 359–369, 1996.

LYNG, H.; HARALDSETH, O.; ROFSTAD, E. Measurement of cell density and necrotic fraction in human melanoma xenografts by diffusion weighted magnetic resonance imaging. *Magnetic resonance in medicine*, Wiley Online Library, v. 43, n. 6, p. 828–836, 2000.

MAHESHWARI, G.; LAUFFENBURGER, D. Deconstructing (and reconstructing) cell migration. *Microscopy research and technique*, v. 43, n. 5, p. 358–368, 1998.

MANTOVANI, A. *et al.* Cancer-related inflammation. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 454, n. 7203, p. 436–444, 2008.

MARQUES, C. *Tissue engineered human skin models to study the effect of inflammation on melanoma invasion*. Tese (Doutorado) — The University of Sheffield, 2010.

MI, Q. *et al.* One-dimensional elastic continuum model of enterocyte layer migration. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 93, n. 11, p. 3745–3752, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *ESTIMATIVA 2012: Incidência de Câncer no Brasil*. 2012.

PRASS, M. *et al.* Direct measurement of the lamellipodial protrusive force in a migrating cell. *The Journal of cell biology*, Rockefeller Univ Press, v. 174, n. 6, p. 767–772, 2006.

REDPATH, M. *et al.* Ibuprofen and hydrogel-released ibuprofen in the reduction of inflammation-induced migration in melanoma cells. *British Journal of Dermatology*, Wiley Online Library, v. 161, n. 1, p. 25–33, 2009.

RIDLEY, A. *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 302, n. 5651, p. 1704–1709, 2003.

SENGERS, B.; PLEASE, C.; OREFFO, R. Experimental characterization and computational modelling of two-dimensional cell spreading for skeletal regeneration. *Journal of The Royal Society Interface*, The Royal Society, v. 4, n. 17, p. 1107–1117, 2007.

SETHIAN, J. *LEVEL SET METHODS: EVOLVING INTERFACES IN GEOMETRY, FLUID MECHANICS.*. [S.l.: s.n.], 1996.

SMITH, K.; WEAVER, J. Electrodifusion of molecules in aqueous media: A robust, discretized description for electroporation and other transport phenomena. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, IEEE, v. 59, n. 6, p. 1514–1522, 2012.

TJIA, J.; MOGHE, P. Regulation of cell motility on polymer substrates via "dynamic," cell internalizable, ligand microinterfaces. *Tissue engineering*, Mary Ann Liebert, Inc., v. 8, n. 2, p. 247–261, 2002.

TOHYA, S. *et al.* On rugged shape of skin tumor (basal cell carcinoma). *Journal of theoretical biology*, Elsevier, v. 194, n. 1, p. 65–78, 1998.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Skin Cancers*. 2012.

WYNN, M.; KULESA, P.; SCHNELL, S. Computational modelling of cell chain migration reveals mechanisms that sustain follow-the-leader behaviour. *Journal of The Royal Society Interface*, The Royal Society, v. 9, n. 72, p. 1576–1588, 2012.

ZHU, N. *et al.* Melanoma cell attachment, invasion, and integrin expression is upregulated by tumor necrosis factor α and suppressed by α melanocyte stimulating hormone. *Journal of investigative dermatology*, Nature Publishing Group, v. 119, n. 5, p. 1165–1171, 2002.

ZHU, N. *et al.* Melanoma cell migration is upregulated by tumour necrosis factor- α and suppressed by α -melanocyte-stimulating hormone. *British journal of cancer*, Nature Publishing Group, v. 90, n. 7, p. 1457–1463, 2004.